



ETUDES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DE L'ATPASE-CA₂⁺ DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE (SERCA1A). EFFETS DES CONDITIONS DE CRISTALLISATION SUR LA CONFORMATION DE L'ATPASE-CA₂⁺

Martin Picard

► To cite this version:

Martin Picard. ETUDES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DE L'ATPASE-CA₂⁺ DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE (SERCA1A). EFFETS DES CONDITIONS DE CRISTALLISATION SUR LA CONFORMATION DE L'ATPASE-CA₂⁺. Biochimie [q-bio.BM]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2005. Français. NNT : . tel-00011390

HAL Id: tel-00011390

<https://theses.hal.science/tel-00011390>

Submitted on 16 Jan 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS VI – Pierre et Marie Curie

Ecole Doctorale Inter///Bio (ED387)

"Interfaces de la Chimie, de la Physique et de l'Informatique avec la Biologie"

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Spécialités : Biochimie et Biophysique

Présentée et soutenue publiquement le 9 décembre 2005 par

Martin PICARD

**ETUDES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES
DE L'ATPASE- Ca^{2+} DU RETICULUM SARCOPLASMIQUE (SERCA1A)**

**EFFETS DES CONDITIONS DE CRISTALLISATION
SUR LA CONFORMATION DE L'ATPASE- Ca^{2+}**

Directeur de thèse : Philippe CHAMPEIL

JURY

Mme MINTZ Elizabeth
M. GHAZI Alexandre
M. NISSEN Poul
M. PICOT Daniel
M. DELETTRE Jean
M. CHAMPEIL Philippe

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Président du jury
Directeur de thèse

J'ai réalisé ce travail de thèse dans un environnement scientifique et matériel très privilégié. J'aimerais commencer par remercier pour leur accueil les différents responsables des tutelles dont relève le laboratoire: Alain Desbois, directeur de l'URA CNRS 2096, et Marc Lutz et Bruno Robert, chefs successifs du Service de Biophysique des Fonctions Membranaires (SBFM, CEA). Merci aussi à Pierre Legrain, directeur du Département de Biologie Joliot-Curie (DBJC), pour ses précieux conseils. Enfin j'aimerais remercier Marc le Maire, chef du laboratoire de transport membranaire et détoxification, pour son soutien et pour l'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail.

Bien évidemment, je tiens à remercier tout particulièrement Philippe Champeil, dont les qualités scientifiques, pédagogiques et humaines m'ont impressionné chaque jour un peu plus. J'espère que ces trop courtes années de thèse à ses côtés m'auront permis de commencer à acquérir un peu de la curiosité, de l'esprit critique, et de la rigueur que tout le monde lui reconnaît.

Cette thèse a été possible grâce au soutien financier du programme Human Frontier dans le cadre d'un projet animé par Chikashi Toyoshima, et géré au laboratoire par Françoise Schont (merci à elle !). J'aimerais remercier Chikashi pour cette fantastique opportunité de participer à ce projet, et pour avoir toujours montré une grande attention à l'évolution de mon travail et une grande disponibilité.

Ces années de thèse ont été enrichissantes d'un point de vue scientifique mais aussi humain : le couloir du troisième étage est peuplé de personnes toutes aussi sympathiques et intéressantes les unes que les autres. Merci à Christine Jaxel, Véronica Beswick, Françoise Ochsenbein, Nadège Jamin, Béatrice de Foresta, Adrienne Gomez-de-Gracia, Josiane Piles, Pascale Filoche, Stéphane Orlowski, Manuel Garrigos, Pierre Falson, Jean-Michel Neumann, Raphaël Guérois, Lionel Perrin, François André, Pierre Nédellec, Aldo ... Et à nos visiteurs réguliers : Jocelyne Ergotte, Maité Paternostre, Ghada Ajlani, Marcel Delaforge, Christian Schneider, Jean-Marc Verbavatz, Massimo Marchi, Yves Penn, Francis Haraux

Et la relève est assurée : merci à Marie, Solène, Aurélie, Carole, Florence, Morgane, Pauline, Emmanuelle, Béatrice, Delphine, Frédérique, Nathalie, Guillaume, Cédric, JB, David, Zoltan, Houcine, Samuel, Jérôme, Gino, Somchit, Alexandre, Thien-An, Vincent M, Vincent C ...

Merci à vous tous pour votre aide et pour votre soutien !

J'ai également eu la chance de collaborer avec des équipes extérieures au laboratoire. Mon initiation à l'étude des polymères amphiphiles a été très chaleureuse, notamment grâce à la bonne humeur de Tassadite Dahmane, de Manuela Zoonens et de Caroline Duval-Terrié et grâce à l'expertise et l'optimisme permanent de Jean-Luc Popot et d'Emmanuelle Dé.

Le séjour au laboratoire de Johannes Clausen a été lui aussi particulièrement sympathique. Ses conseils avisés, ainsi que ceux de Jens Peter Andersen, n'auront pas été de trop pour comprendre les subtilités (et les contrariétés !) de la méthodologie « QFM ».

J'ai aussi eu l'opportunité de faire un court séjour au Danemark au printemps 2005, dans le laboratoire de Poul Nissen. J'y ai rencontré une jeune équipe dynamique, disponible et efficace, que j'aurai grand plaisir à retrouver à l'occasion de mon stage post-doctoral.

Merci aussi à Marc Nadal, de l'Université Versailles Saint-Quentin (ainsi qu'aux étudiants de Bi201 et Bi232), de m'avoir permis de faire quelques pas dans cette fantastique aventure qu'est l'enseignement.

Je remercie tout spécialement Elizabeth Mintz, Jean Delettré, Alexandre Ghazi, Daniel Picot et Poul Nissen d'avoir bien voulu accepter de faire partie de mon jury de thèse.

Enfin, je n'oublie pas non plus mon entourage. Merci à ma famille et à ma belle-famille pour son soutien de tous les instants, merci à Biochanco, aux krobards, et bien sûr ...

merci à Mouna pour son soutien, sa patience et son indéfectible confiance

Abréviations

18C₁₀ : polymère amphiphile constitué d'un polysaccharide, le pullulane, sur lequel sont greffées des chaînes décyles hydrophobes.

A8-35 : polymère amphiphile constitué d'un squelette polyacrylique sur lequel sont greffées des chaînes octyles hydrophobes.

ADP : adénosine 5'-diphosphate.

Récepteur AMPA : récepteur ionotropique activé par le glutamate.

AMPPCP : adénosine 5'-(β,γ -méthylènetriphosphate).

ATP : adénosine 5'-triphosphate.

ATPase-Ca²⁺ : adénosine triphosphatase.

TNP-ATP : 2',3'-O-(2,4,6- trinitrophényl) adénosine 5'-triphosphate.

BHQ : 2,5-di-*tert*-butyl-1,4-dihydroxybenzène.

C₁₂E₈ : octaéthylèneglycol monododécyléther.

CICR : calcium-induced calcium release.

CIF : calcium influx factor.

CMC : concentration micellaire critique.

CPA : acide cyclopiazonique.

DDM : dodécylmaltoside.

DHPR : récepteur à la dihydropyridine.

DMSO : diméthyl-sulfoxyde.

EDTA : acide éthylènediamine tétraacétique.

EGTA : acide [éthylènebis-(oxyéthylènenitrilo)]tétraacétique.

ER/SR : réticulum endoplasmique/réticulum sarcoplasmique.

ESPCI : Ecole supérieure de physique et de chimie industrielles.

FASEB : Federation of American Societies for Experimental Biology.

FITC : 5'-isothiocyanate de fluorescéine.

HAD : protéines de la famille des déhalogénases.

IBPC : Institut de Biologie Physico-Chimique.

IP3 : inositol triphosphate.

LDH : lactate deshydrogénase.

M55/Cals : protéine M55 et calséquestrine (protéines présentes dans nos membranes de SR).

Mes : acide 2-[N-morpholino]éthanesulfonique.

Mops : acide 3-[*N*-morpholino]propanesulfonique.

Récepteur nACh : récepteur nicotinique à l'acétylcholine.

NADH : nicotine-adénine dinucléotide réduit.

NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Ni-NTA : Ni^{2+} -acide nitrilo-triacétique.

PEP : phosphoénol pyruvate.

Pi : phosphate inorganique.

PK : pyruvate kinase.

PKA : protéine kinase A.

PMCA : plasma membrane Ca^{2+} -ATPase.

PMR1: plasma membrane ATPase related Ca^{2+} -ATPase.

PMSF : phénylméthylsulfonyl fluorure.

PTP : permeability transition pore.

quin2 : acide 2-[(2-amino-5-méthylphénoxy)méthyl]-6-méthoxy-8-aminoquinoline-N,N,N',N'-tétraacétique .

RMN : résonance magnétique nucléaire.

ROC : Receptor-Operated Channels.

ROESY : mesure des effets Overhauser dans le référentiel tournant.

RYR : récepteur à la ryanodine.

SAPol : sulfonated amphipol.

SDS : sodium dodécyl sulfate.

SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (*i.e*, en conditions dénaturantes).

SERCA1a : ATPase- Ca^{2+} du réticulum sarco(endo)plasmique.

SOC : Store-Operated Channels.

CRAC : Ca^{2+} -Release-Activated Channels.

SPCA : secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ ATPases.

TCA : acide trichloroacétique.

TEMED : N,N,N',N'-Tetraméthyléthylènediamine.

Tes : acide 2-{[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxyméthyl)éthyl]amino} éthanesulfonique.

TG : thapsigargine.

TNP-AMP : 2'(3')-*O*-(2,4,6-trinitrophényle)adénosine 5'-monophosphate.

Tris : *tris*(Hydroxyméthyl)aminométhane.

VOCs : Voltage-Operated Channels.

Sommaire

Chapitre I : Introduction

pp. 1-37

I. Le calcium intracellulaire et sa régulation

pp. 1-16

1. Quelques mots sur les différents types de signaux calcium
2. Protéines solubles sensibles au Ca^{2+} : tampons, senseurs et effecteurs
3. Protéines membranaires responsables des mouvements de calcium
 - 3.1. Protéines impliquées dans les *augmentations* du calcium cytoplasmique
 - 3.2. Protéines impliquées dans *le maintien ou le retour* du calcium cytoplasmique à une valeur basse
4. Les pompes à calcium présentes sur la membrane du réticulum endoplasmique : les « SERCAs », des ATPases « de type P »
 - 4.1. Phylogénie des ATPases « de type P »
 - 4.2. les différentes SERCAs: isoformes, localisations, implication lors de dysfonctionnements pathologiques
 - 4.2.1. *SERCA1*
 - 4.2.2. *SERCA2*
 - 4.2.3. *SERCA3*
 - 4.2.4. *Addendum : SERCA et la malaria*

II. Fonctionnement de SERCA1a

pp. 17-37

1. Cycle catalytique global
2. Vers une description structurale de ce cycle ?
3. Organisation générale de l'ATPase : structure de base E1Ca_2
4. Fixation de calcium
5. Fixation d'ATP, phosphorylation et occlusion du calcium
6. Transition $\text{Ca}_2\text{E1P-E2P}$ et relargage du calcium du côté luminal
7. Déphosphorylation
8. Transition E2-E1 et contre-transport de protons

Chapitre II : Contenu de la présente thèse

pp. 38-40

Chapitre III : Matériel et Méthodes, avec en outre quelques résultats non encore soumis à publication

pp. 41-59

1. Caractérisation sommaire des membranes préparées à partir du réticulum sarcoplasmique de lapin.
2. Activité ATPasique de ces membranes.
Exemple : dépendance en pCa de l'activité hydrolytique de l'ATPase solubilisée
3. Protéolyse ménagée éventuelle à la protéinase K et analyse par SDS-PAGE.
Application : effet de la TG sur la protéolyse de l'ATPase en absence de Ca^{2+}
4. Phosphorylation de l'ATPase par le $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ ou le $[^{32}P]Pi$, mesurée par filtration après arrêt acide.
5. Phosphorylation de l'ATPase par le $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ ou le $[^{32}P]Pi$, mesurée après électrophorèse de la protéine.
Exemple : affinité apparente pour le Pi lors d'une phosphorylation en absence de Ca^{2+} .
6. Mesures de fluorescence à l'équilibre.
Application : changements de fluorescence intrinsèque pour une ATPase mutée dans l'un de ses sites Ca^{2+} , ou mutée au niveau de l'un de ses résidus Trp.
7. Mesure optique d'une réaction sur de courtes échelles de temps, après mélange rapide et flux interrompu (« stopped-flow »).
Application : différenciation spectroscopique des sous-étapes impliquées dans la dissociation du Ca^{2+} .
8. Mesure par fluorescence de la vitesse de dissociation du Ca^{2+} , en présence de « quin2 ».
Exemple : calibration de la mesure.
9. Transport ou fixation non covalente de ligand, mesurés par filtration manuelle.
10. Filtration rapide.
Exemple : vitesse de dissociation du $^{45}Ca^{2+}$ initialement lié à l'ATPase. Comparaison avec la méthode au quin2.
11. Mesure chimique d'une réaction sur de courtes échelles de temps, après mélange rapide et arrêt rapide de la réaction (« quench flow »).
Application : mesure de la vitesse à laquelle, lors de la dissociation du Ca^{2+} , l'ATPase cesse d'être phosphorylable par l'ATP.

Chapitre IV: premiers travaux. Etudes fonctionnelles d'enzymes modifiées

pp. 60-70

1. ATPase protéolysée : propriétés fonctionnelles de SERCA après clivage au site Leu119-Lys120, près du domaine A (Manuscrit # 1) pp. 60-66

2. ATPase mutée : rôle de la « boucle L6-7 » dans l'activation de l'ATPase-Ca²⁺ par le Ca²⁺ et l'ATP (Manuscrit # 2) pp. 67-70

3. Manuscrit # 1:

Functional properties of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase after proteolytic cleavage at Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰, close to the A-domain.

Lenoir, G., Picard, M., Gauron, C., Montigny, C., Le Maréchal, P., Falson, P., le Maire, M., Møller, J.V., and Champeil, P. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 9156-9166.

4. Manuscrit # 2:

Involvement of the L6-7 loop in SERCA1a Ca²⁺-ATPase activation by Ca²⁺ (or Sr²⁺) and ATP
Lenoir, G., Picard, M., Møller, J.V., le Maire, M., Champeil, P., and Falson, P. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 32125-32133.

Chapitre V: Influence des conditions de cristallisation sur la conformation de l'ATPase-Ca²⁺

pp. 71-92

1. Effet d'une concentration élevée de Ca²⁺ sur la conformation adoptée par l'enzyme en présence d'AMPPCP (Manuscrit # 3) pp. 71-81

1.1. Occlusion des sites Ca²⁺ en présence d'AMPPCP et en absence de Ca²⁺ ? Non !

1.2. Un effet du milieu de cristallisation ?

1.3. Effet d'une forte concentration en Ca²⁺ sur la conformation de l'ATPase

1.4. Evaluation directe de la capacité des sites de fixation du Ca²⁺ à s'ouvrir, lorsque le milieu contient à la fois AMPPCP et fort Ca²⁺ : mesures d'échange ⁴⁵Ca²⁺/⁴⁰Ca²⁺ par filtration rapide

1.5. Conclusion

2. Effet de la présence d'inhibiteurs de l'ATPase sur l'accessibilité luminale des sites Ca²⁺ dans les formes « E2P-like » (Manuscrit # 4) pp. 82-92

2.1. Fluorescence intrinsèque des différents complexes fluorés

2.2. Mesures de la fixation de ⁴⁵Ca²⁺ du côté luminal, après réaction de l'ATPase avec les fluorures

2.3. Conclusions

3. Manuscrit # 3:

The average conformation at micromolar [Ca²⁺] of Ca²⁺-ATPase with bound nucleotide differs from that adopted with the transition state analog ADP.AIFx or with AMPPCP under crystallization conditions at millimolar [Ca²⁺].

Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. (2005). *J. Biol. Chem.* 280, 18745-18754.

4. Manuscrit # 4:

Effects of inhibitors on luminal opening of Ca²⁺ binding sites in an E2P-like complex of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase with Be²⁺-fluoride

Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. (2005) *Accepté dans J. Biol. Chem.*

Chapitre VI: Interaction des membranes de réticulum et de leur ATPase-Ca²⁺ avec les polymères amphiphiles.

pp. 93-105

1. Protection des membranes de réticulum contre leur floculation (Manuscrit # 5)

pp. 94-96

- 1.1. Introduction
- 1.2. Résultats et discussion

2. Effet de différents amphipols sur l'ATPase-Ca²⁺: protection ou inhibition? (Manuscrit # 6)

pp. 97-105

- 2.1. Introduction
- 2.2. Préliminaires : effet des ions divalents sur l'agrégation de l'amphipol seul en solution
- 2.3. Effet de différents amphipols sur l'activité ATPasique de SERCA1a
- 2.4. Effet protecteur des différents amphipols vis-à-vis de la dénaturation irréversible de l'ATPase solubilisée, lors de son incubation dans un milieu dépourvu de Ca²⁺
- 2.5. Effet protecteur des différents amphipols vis-à-vis de la dénaturation irréversible de l'ATPase lors de sa dilution dans un milieu dépourvu de détergent
- 2.6. Une expérience clef ? Effet des amphipols sur une étape particulière, la dissociation du calcium
- 2.7. Conclusions

3. Manuscrit # 5 :

Stabilization of membranes upon interaction of amphipathic polymers with membrane proteins.

Picard, M., Duval-Terrié, C., Dé, E., and Champeil, P. (2004)
Protein Science 13, 3056-3058.

4. Manuscrit # 6 :

Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study.

Picard, M., Dahmane, T., Garrigos, M., Gauron, C., Giusti, F., le Maire, M., Popot, J.-L., and Champeil, P.
Accepté dans Biochemistry.

Conclusion

pp. 106-112

Bibliographie

pp. 113-130

Chapitre I : Introduction

I. Le calcium intracellulaire et sa régulation.

1. Quelques mots sur les différents types de signaux calcium
2. Protéines solubles sensibles au Ca^{2+} : tampons, senseurs et effecteurs
3. Protéines membranaires responsables des mouvements de calcium
 - 3.1. Protéines impliquées dans les *augmentations* du calcium cytoplasmique Phylogénie des ATPases « de type P »
 - 3.2. Protéines impliquées dans *le maintien ou le retour* du calcium cytoplasmique à une valeur basse
4. Les pompes à calcium présentes sur la membrane du réticulum endoplasmique : les « SERCAs », des ATPases « de type P »
 - 4.1. Phylogénie des ATPases « de type P »
 - 4.2. les différentes SERCAs: isoformes, localisations, implication lors de dysfonctionnements pathologiques
 - 4.2.1. *SERCA1*
 - 4.2.2. *SERCA2*
 - 4.2.3. *SERCA3*
 - 4.2.4. *Addendum : SERCA et la malaria*

II. Fonctionnement de SERCA1a

1. Cycle catalytique global
2. Vers une description structurale de ce cycle ?
3. Organisation générale de l'ATPase : structure de base E1Ca_2
4. Fixation de calcium
5. Fixation d'ATP, phosphorylation et occlusion du calcium
6. Transition $\text{Ca}_2\text{E1P-E2P}$ et relargage du calcium du côté luminal
7. Déphosphorylation
8. Transition E2-E1 et contre-transport de protons

Chapitre I : Introduction

I. Le calcium intracellulaire et sa régulation.

Au repos, la cellule maintient une concentration de calcium libre très basse dans le cytoplasme, inférieure à une centaine de nanomoles par litre, alors que la concentration de calcium est presque 10000 fois plus élevée à l'extérieur de la cellule, et sans doute presque autant dans certains compartiments internes de la cellule comme le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi. La Figure 1 représente une cellule-type, avec certains des acteurs, qui seront présentés plus loin, de ce contrôle du calcium.

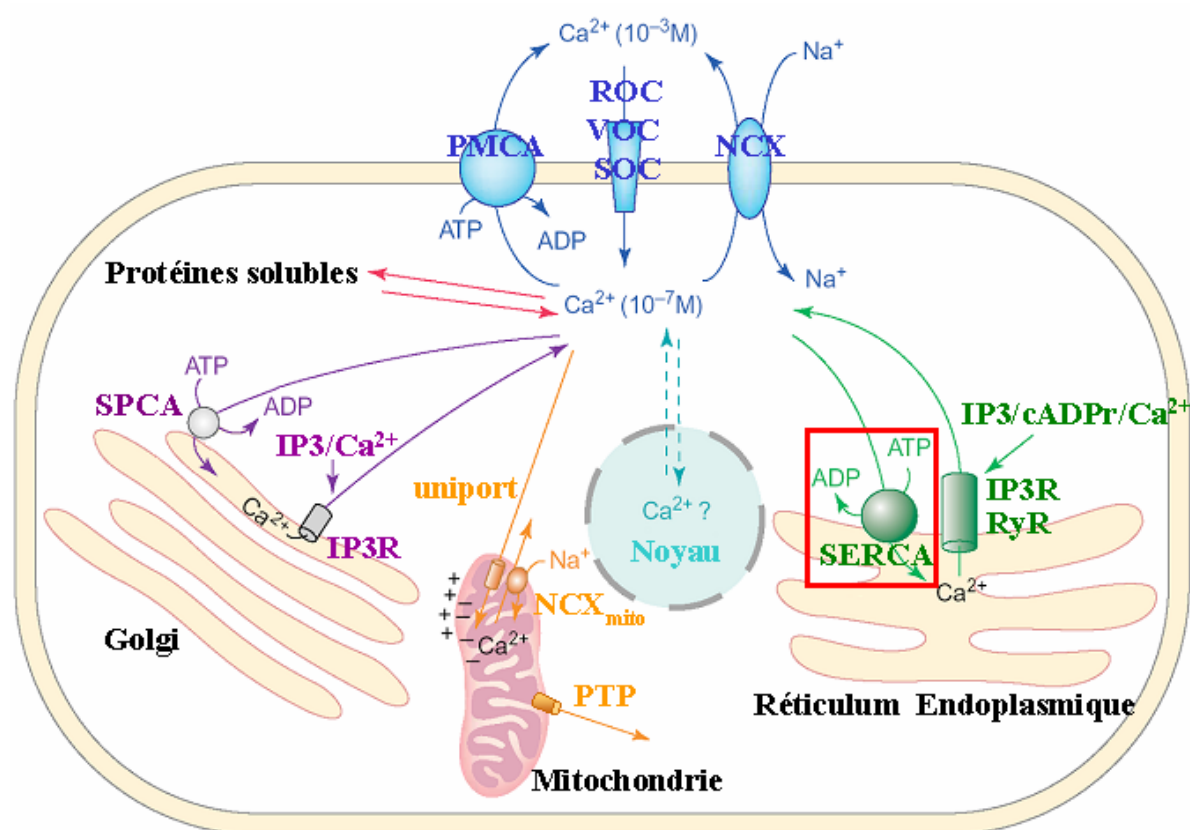


Figure 1. Signalisation calcique. Figure adaptée de (Carafoli 2004)

De la fertilisation de l'ovocyte au développement de certains cancers en passant par les mécanismes de l'apprentissage, le calcium joue un rôle crucial durant toutes les étapes de la vie d'un organisme (Berridge et al. 2000; Carafoli 2002). Le calcium intervient dans le cadre de la signalisation cellulaire, en jouant un rôle de second messenger ubiquitaire, et dans le cadre de mécanismes physiologiques spécifiques à certains tissus, en déclenchant des réponses concertées (activation ou répression de la transcription de certains gènes, libération de neurotransmetteurs, mouvements ciliaires, contraction musculaire ...). Dans ces différentes situations, la concentration de Ca^{2+} dans le cytoplasme cellulaire varie en réponse à un stimulus particulier (que ce soit par entrée de calcium externe ou par mobilisation de calcium interne), et la cellule interprète cette variation en tant que signal physiologique spécifique:

l'homéostasie calcique doit donc être régulée de façon extrêmement fine, d'autant plus que la concentration en Ca^{2+} ne doit rester élevée dans le cytoplasme que de façon transitoire (une concentration de Ca^{2+} trop élevée pendant trop longtemps peut devenir toxique). Nous décrirons d'abord différents types de signaux calcium. Puis nous présenterons sommairement les différents acteurs du contrôle, de la reconnaissance ou de la modulation de la concentration de Ca^{2+} . Nous discuterons ensuite plus spécifiquement de certains de ces acteurs, les « SERCAs », des ATPases membranaires qui transportent le calcium du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique (ou son équivalent dans les tissus musculaires, le réticulum sarcoplasmique). Ces protéines membranaires appartiennent à la famille des « ATPases de type P », responsables notamment du transport actif de nombreux ions à travers les membranes biologiques.

1. Quelques mots sur les différents types de signaux calcium

La cellule peut engendrer une multitude de réponses physiologiques à une variation de la concentration de calcium (Berridge et al. 2000). Une première explication de cette diversité réside dans le fait que toutes les cellules n'expriment pas les mêmes protéines cibles du calcium : la nature des senseurs et des effecteurs interagissant avec le calcium dans le cytoplasme sont autant de facteurs menant à autant de réponses. Mais ces différentes cibles du calcium peuvent aussi coexister au sein d'une même cellule, chacune étant localisée dans une région spécifique de la cellule (par exemple dans le cas des cellules neuronales), et cette différenciation spatiale est aussi source de diversité. Enfin, une différenciation temporelle du signal est aussi possible : en effet, l'ouverture des canaux calciques puis le transport du calcium vers les citernes intracellulaires ou l'extérieur de la cellule peut aboutir à l'apparition d'*oscillations* périodiques sur l'ensemble de la cellule, dont la fréquence peut être décodée pour aboutir à une réponse ou une autre. En effet, certaines molécules, comme la protéine kinase II Ca^{2+} /calmoduline-dépendante (CaMKII) ou la protéine kinase C, répondent de façon différente à des fréquences basses ou élevées : il a par exemple été décrit que le facteur de transcription NF κ B était activé par des fréquences faibles, alors que le facteur de transcription NFAT était activé par des fréquences plus grandes. Dans le foie, la fréquence des oscillations de la concentration de calcium a également des conséquences sur le métabolisme : l'augmentation de la fréquence des pics de calcium active l'enzyme responsable de la dégradation du glycogène.

Le caractère oscillatoire des variations de calcium cellulaire et les mécanismes qui y aboutissent ont été notamment décrits dans le cas des événements dépendant de l'IP3 (inositol triphosphate, un second messager produit par l'hydrolyse d'un phospholipide particulier, en réponse à certaines stimulations cellulaires). On avait initialement considéré que la formation d'IP3 suffisait à induire l'ouverture de canaux à la surface de certains réservoirs intracytoplasmiques de calcium. En réalité, dans beaucoup de cas, l'ouverture du canal récepteur de l'IP3 dépend aussi de façon cruciale de la concentration de calcium libre cytosolique présent au voisinage de ce récepteur. Une certaine concentration de calcium cytosolique « sensibilise » le récepteur à l'IP3 (c'est le phénomène de « CICR » dont on reparlera), et vice versa. A partir d'un certain seuil d'IP3, la libération de calcium en un point a donc tout d'abord un effet explosif. La coexistence de cette boucle de rétroaction positive rapide avec des mécanismes d'inhibition différents et plus lents (rétroaction négative) peut à elle seule engendrer des oscillations.

En outre, une libération de calcium en un point peut, via la *diffusion* du calcium, entraîner l'ouverture de canaux récepteurs à l'IP3 *voisins* (ou de canaux récepteurs à la Ryanodine, voir plus loin), entraînant une réaction en chaîne se propageant au sein de la cellule : on parle alors de « vague » calcique. D'une certaine manière, un tel mécanisme

transforme le cytoplasme de n'importe quelle cellule en un milieu excitable (Berridge 1997). Les avancées techniques en terme de microscopie de fluorescence et d'imagerie cellulaire ont permis de mettre en évidence et de mieux comprendre ces processus complexes (Petersen et al. 2005).

Cette vague calcique peut même s'étendre d'une cellule à l'autre par l'intermédiaire des jonctions communicantes, et une telle propagation inter-cellulaire peut avoir des implications physiologiques, par exemple pour la synchronisation du battement des cellules ciliées à la surface de l'épithélium respiratoire ou, dans le foie, pour la sécrétion biliaire et les contractions canaliculaires. Comme pour beaucoup de mécanismes oscillatoires en biologie, les modélisations ont eu un grand rôle pour comprendre l'origine et la nature de ces oscillations (Swillens et al. 1999).

2. Protéines solubles sensibles au Ca^{2+} : tampons, senseurs et effecteurs

Si, comme nous l'avons vu précédemment, la cellule est sensible aux variations de concentration de calcium dans le cytoplasme et aussi aux caractéristiques temporelles de ces variations, c'est qu'il existe dans la cellule des protéines, souvent solubles, susceptibles de lier le Ca^{2+} , et dont le fonctionnement va être affecté par le Ca^{2+} : des senseurs ou des effecteurs du Ca^{2+} ; certaines autres protéines ont simplement pour rôle de tamponner la concentration de calcium dans la cellule, un rôle important pour la modulation de l'intensité et de la durée des signaux calcium.

Parmi les protéines sensibles au Ca^{2+} , la plupart contiennent des motifs de type « EF-hand » (Kretsinger 1972), et parmi celles-ci certaines sont des enzymes calcium-dépendantes (c'est par exemple le cas de la calpaine et de la calcineurine, protéases ayant un rôle dans l'activation de voies apoptotiques). Au contraire, d'autres protéines ne contiennent pas de motifs EF-hands (ex: gelsoline et annexines). Les protéines de type EF-hand, dont on compte environ 600 membres, exercent leur action en changeant de conformation après fixation de calcium (leur domaines hydrophobes devenant alors plus exposés).

Dans les cellules excitables, nous avons mentionné précédemment qu'un même signal calcique peut être interprété différemment selon sa localisation sub-cellulaire. Cette propriété est justement rendue possible par l'existence de protéines tampons, dont l'un des effets est de ralentir la diffusion du signal calcique. Par exemple, la parvalbumine (dont la structure, déterminée par Kretsinger et al. est à l'origine de la caractérisation de la famille de protéines « EF-hand ») et la calbindine jouent ce rôle. Dans les neurones, certaines protéines sont au contraire des « senseurs »: c'est par exemple le cas de la synaptotagmine, senseur pour l'exocytose. Dans le cytoplasme du muscle squelettique, la troponine C inhibe l'interaction actine myosine: cette inhibition est levée quand la troponine C fixe le calcium. Et c'est encore après fixation de Ca^{2+} que la calmoduline peut stimuler une phosphorylase kinase, qui va activer la glycogénolyse et permettre l'augmentation de la concentration en ATP (Berridge et al. 2000).

A l'intérieur des compartiments intracellulaires, par exemple celui délimité par le réticulum endoplasmique, de nombreuses protéines sont également présentes, dont plusieurs lient elles aussi le calcium (par exemple, dans le muscle squelettique, la calséquestrine, la protéine tampon majeure de la lumière du réticulum sarcoplasmique de muscle rapide) (Meldolesi and Pozzan 1998). Certaines de ces protéines intra-réticulaires ont, de nouveau, un fonctionnement différent selon la concentration de Ca^{2+} . Ainsi, la concentration de calcium dans la lumière du réticulum endoplasmique influence sûrement le repliement des protéines. Il faut en effet garder à l'esprit que le réticulum est avant tout le lieu de fabrication des

protéines, en présence de protéines « chaperonnes » qui permettent un repliement adéquat des protéines synthétisées. Et ces protéines chaperonnes peuvent être sensibles au Ca^{2+} . C'est par exemple le cas de la calréticuline et de la protéine BiP (Meldolesi and Pozzan 1998; Corbett and Michalak 2000).

3. Protéines membranaires responsables des mouvements de calcium

Certaines protéines mises en jeu dans la régulation de l'homéostasie calcique doivent maintenir ou rétablir des gradients électrochimiques très importants; d'autres doivent être capables de permettre un afflux massif de calcium dans le cytoplasme, en réponse à certains stimuli. Nous discuterons dans un premier temps des différents mécanismes d'*augmentation* du calcium cytosolique, puis nous décrirons les mécanismes de *repompage* du Ca^{2+} , du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule ou encore vers la lumière des compartiments internes (Berridge et al. 2000). L'ensemble de ces mécanismes et la localisation des différents acteurs de cette régulation sont résumés sur la Figure 1 précédemment montrée.

3.1. Protéines impliquées dans les augmentations du calcium cytoplasmique

Ce sont des *canaux* membranaires qui, en s'ouvrant, permettent l'entrée de quantités importantes de Ca^{2+} dans le cytoplasme.

Dans certains cas, l'augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium est la conséquence de l'ouverture de *canaux situés à la surface cellulaire*. Différents types de canaux peuvent être impliqués.

Dans le cas des cellules excitables, ce sont souvent des canaux dits « voltage-dépendants » (VOCs ou Voltage-Operated Channels), sensibles aux variations du potentiel de membrane, qui vont permettre l'entrée de calcium. Les effets d'une telle entrée de calcium dans un neurone peuvent être différents, on l'a dit, selon la localisation de l'augmentation de la concentration de calcium. Au niveau d'une terminaison synaptique, un pic de concentration de calcium peut déclencher l'exocytose de neurotransmetteurs, alors que l'activation de canaux voltage-dépendants situés au niveau du corps cellulaire peut déclencher des cascades de signalisation aboutissant à la régulation de la transcription de certains gènes.

Dans le cas de cellules non excitables, une multitude de canaux sont susceptibles d'être activés, permettant une entrée massive de calcium. Ces récepteurs-canaux, sensibles aux neurotransmetteurs (AMPA, nACh ...), sont plus généralement appelés ROCs, pour « Receptor-Operated Channels ».

De plus, certains canaux de la membrane plasmique sont sensibles à la concentration de calcium dans les compartiments internes : une concentration faible en Ca^{2+} dans le Réticulum Endoplasmique (RE) conduit à l'ouverture de ces canaux (appelés SOC, Store-Operated Channels ou CRAC pour Ca^{2+} -Release-Activated Channels), un mécanisme qualifié d'ouverture « capacitative ». Cette communication entre un compartiment interne et un canal de la membrane plasmique n'est pas encore bien comprise. On a longtemps supposé l'existence d'un facteur soluble, baptisé CIF (pour calcium influx factor), dont le rôle serait d'induire l'ouverture de ces canaux quand les compartiments internes se vident (Berridge 1997). Il a aussi été proposé que les compartiments internes et les SOC soient couplés physiquement (Berridge 1995). Depuis peu, certains soutiennent que les SOC sont l'équivalent chez les vertébrés des canaux TRP (transient receptor potential) mis en évidence pour la première fois chez la drosophile (Berridge 1997). Les TRP constituent une famille de protéines impliquées dans la réponse à divers stimuli sensoriels, tels que la lumière (la

réponse de certains photorécepteurs à la lumière est basée sur une entrée de calcium de type « capacitatif »), les variations de température ou les variations d'osmolarité, et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que l'audition (Corey 2003), la réponse inflammatoire (Li et al. 2002) ou la régulation de la fonction cardiaque (Inoue et al. 2001). Plusieurs de ces canaux TRP sont perméables au Ca^{2+} (c'est par exemple le cas de certains récepteurs des sous-familles TRP V, TRP M et TRP A) mais leur sélectivité vis à vis du Ca^{2+} varie, et la plupart sont non spécifiques. L'hypothèse selon laquelle les SOC's seraient des canaux de type TRP n'a toutefois jamais été prouvée, et fait l'objet d'un débat (Clapham 2003).

D'autres canaux permettent de faire passer le Ca^{2+} à travers la membrane plasmique, sans pour autant être sélectifs vis à vis du Ca^{2+} (Nowycky and Thomas 2002). C'est le cas de certains canaux ouverts sous l'action de stimuli sensoriels tels que des molécules odorantes et la lumière, les canaux sensibles aux nucléotides cycliques (CNGC, cyclic nucleotide-gated channels). D'autres s'ouvrent en réponse à des stimuli physiques, comme les cellules ciliées de l'oreille interne (Ghazi et al. 1998).

Dans d'autres cas, la cellule peut aussi mettre en œuvre des mécanismes aboutissant à l'ouverture de *canaux situés sur les membranes de compartiments internes riches en calcium*, tout particulièrement le réticulum endoplasmique. Par exemple, de nombreux récepteurs localisés à la surface de la membrane plasmique, couplés à de petites protéines G ou ayant eux-même une activité tyrosine kinase, activent des voies de signalisation aboutissant à la formation d'inositol triphosphate (IP3) (Berridge 1993). En se fixant sur un récepteur-canal (IP3R) situé à la surface du réticulum endoplasmique, cet IP3 induit un changement de conformation du récepteur, l'ouverture du canal et la libération de calcium contenu dans le réticulum.

D'autres récepteurs localisés à la surface du réticulum sont susceptibles de s'ouvrir dans certaines conditions. C'est par exemple le cas du récepteur à la Ryanodine (activé par l'ADP ribose cyclique, son ligand endogène, ou bien, dans le cas du muscle à contraction rapide, par un changement de conformation d'un récepteur voltage-dépendant qui lui fait face, le récepteur à la dihydropyridine, voir plus loin). Les récepteurs à l'IP3 et les récepteurs à la Ryanodine ont des similitudes structurales et fonctionnelles et dérivent vraisemblablement d'un ancêtre commun (Berridge 1993; Taylor and Traynor 1995).

Le Ca^{2+} cytosolique lui-même a des effets sur l'ouverture des récepteurs à l'IP3 et à la Ryanodine, par l'intermédiaire d'un mécanisme de régulation positive appelé CICR (pour « calcium-induced calcium release »). Ce type de réponse est mis en marche dans le cadre de la contraction cardiaque, mais aussi dans le cas des vagues calciques.

Au delà du réticulum endoplasmique, d'autres organites intracellulaires sont susceptibles de libérer du Ca^{2+} dans le cytoplasme. La sortie de calcium à partir des mitochondries se fait par l'intermédiaire des canaux PTP et NCX mitochondriaux (voir plus bas), la sortie de calcium de l'appareil de Golgi se fait via un récepteur à l'IP3; les mouvements de calcium entre cytoplasme et noyau (celui-ci possède des récepteurs à l'IP3 et à la Ryanodine à sa surface) sont sujet à controverse (voir (Santella and Carafoli 1997)).

3.2. Protéines impliquées dans le maintien ou le retour du calcium cytoplasmique à une valeur basse

Divers systèmes permettent à la cellule de limiter les augmentations de concentration de calcium libre liées à l'ouverture transitoire de l'un des types de canaux précédemment évoqués, puis de retrouver son état de repos (Martonosi and Pikula 2003) via le repompage du calcium. Ce repompage peut s'effectuer :

- du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule, par la PMCA (plasma membrane Ca^{2+} -ATPase) et par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX exchanger),
- du cytoplasme vers la mitochondrie, par l'intermédiaire de l'uniport Ca^{2+} ,
- du cytoplasme vers les citernes de l'appareil de Golgi, par les pompes SPCA (secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ ATPases),
- et enfin du cytoplasme vers la lumière du réticulum endoplasmique, par les SERCAs (sarcoplasmic or endoplasmic Ca^{2+} -ATPases).

L'ATPase- Ca^{2+} de la membrane plasmique (PMCA) est une protéine de 130 kDa présente dans la plupart des cellules eucaryotes, y compris chez les plantes (Axelsen and Palmgren 2001). Cette enzyme a une grande affinité pour le Ca^{2+} quand elle est couplée à la calmoduline, un de ses activateurs physiologiques ($K_m < 0,5 \mu\text{M}$ en présence de calmoduline). PMCA peut être régulée par phosphorylation, via la protéine kinase A ou la protéine kinase C; de plus, son activité dépend des lipides environnants (Guerini et al. 2005). PMCA est une protéine membranaire à 10 passages transmembranaires, mais dont la plus grosse partie de la masse est située dans le cytosol. Cette partie cytosolique comprend différents domaines dont une région comprenant le site de fixation de l'ATP et l'aspartate catalytique, et une région C-terminale, autoinhibitrice, contenant les domaines de régulation de l'ATPase: site de fixation de la calmoduline et sites de phosphorylation par PKA et PKC. Le site de fixation du Ca^{2+} sur PMCA correspond au site II de SERCA (voir plus loin, dans la deuxième partie de ce chapitre). Chez les mammifères, les PMCA sont codées par 4 gènes. Les quatre isoformes PMCA, ainsi que leurs nombreux variants d'épissage, ont des localisations tissulaires variées (Martonosi and Pikula 2003).

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) catalyse l'échange (électrogénique) de 3 Na^+ pour un Ca^{2+} à travers la membrane plasmique. Cet échange est rendu possible par le gradient de Na^+ maintenu par la pompe Na^+, K^+ et par le potentiel transmembranaire négatif du côté cytosolique. De par sa relativement faible affinité ($>1 \mu\text{M}$) pour le Ca^{2+} , NCX agit probablement le plus efficacement en réponse à des augmentations fortes du calcium cytosolique, et/ou au niveau de microdomaines où la concentration locale de calcium est plus élevée que dans le reste de la cellule. NCX est particulièrement présent dans les cellules excitables (cœur et cellules nerveuses). Les NCX (il en existe 3 isoformes) sont constitués de 9 passages transmembranaires et de larges boucles cytosoliques contenant les sites de régulation.

Le transport de Ca^{2+} du cytoplasme vers la mitochondrie, longtemps considéré (à tort) comme marginal pour la régulation du calcium cytosolique (Rizzuto et al. 2000), fait intervenir un canal situé sur la membrane interne de la mitochondrie, appelé Ca^{2+} uniport. Ce transporteur a une mauvaise affinité pour le calcium. Son activité est primordiale dans les cas extrêmes, souvent pathologiques, où la concentration de calcium devient très élevée dans le

cytoplasme. Il transporte dans la matrice mitochondriale le Ca^{2+} qui s'y accumule alors sous forme de précipités d'hydroxyapatite. Ce transport est facilité par le potentiel de membrane négatif (-80 à -200 mV) généré par la chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Ce stockage de calcium sous forme de dépôts d'hydroxyapatite permet une accumulation de quantités très importantes de calcium en évitant des effets pour le fonctionnement de la mitochondrie qui seraient toxiques (activation permanente d'enzymes sensibles au calcium, effets osmotiques ...), car la concentration de calcium libre dans la mitochondrie reste modérée (Carafoli 2004). Cette accumulation est potentiellement réversible: si la charge en calcium n'est pas exagérément forte, le calcium sera relargué de la mitochondrie vers le cytoplasme *via* le « NCX mitochondrial ». Le NCX mitochondrial est un transporteur analogue à celui retrouvé au niveau de la membrane plasmique, transportant Na^+ et Ca^{2+} avec la même stœchiométrie que précédemment décrit.

Dans des conditions physiologiques, la mitochondrie a aussi un rôle dans la régulation de la concentration calcique (modulation de la forme et des propriétés spatio-temporelles des oscillations calciques, voir paragraphe précédent). Toutefois, de par sa mauvaise affinité, ce transport ne peut avoir lieu que dans des régions où le calcium atteint localement des concentrations micromolaires, en particulier dans des régions (hotspots) où la mitochondrie et le réticulum endoplasmique sont suffisamment proches. Cette proximité permet des échanges entre ces organites. Cet étroit partenariat entre réticulum endoplasmique et mitochondrie joue un rôle central dans l'une des voies utilisées par la cellule pour induire le phénomène d'apoptose (Orrenius et al. 2003).

Notons finalement que la mitochondrie contient également un autre système de transport, le « PTP » (permeability transition pore). Il s'agit d'un pore ayant une haute conductance mais une faible sélectivité pour le calcium: il permet le passage de molécules dont la taille peut atteindre 1500 Da, entre autres le NAD^+ . Il est régulé par le potentiel de membrane et la concentration de calcium et de protons dans la mitochondrie. L'activation du PTP par surcharge excessive en Ca^{2+} de la mitochondrie aboutit à la libération de cytochrome c dans le cytoplasme (d'où l'activation de caspases, protéases activées lors de la mort cellulaire par apoptose ou lors du processus inflammatoire) et à la libération d'autres facteurs pro-apoptotiques (Berridge et al. 2000; Demaurex and Distelhorst 2003; Scorrano et al. 2003).

Le transport de Ca^{2+} vers l'appareil de Golgi fait intervenir une classe de protéines de transport de calcium, apparentées aux SERCAs dont il sera question plus loin, et découvertes il y a une quinzaine d'années dans la levure (sous le nom de PMR1, pour plasma membrane ATPase related) puis chez les mammifères (sous le nom de SPCA, pour secretory pathway Ca^{2+} -ATPase). Deux isoformes ont été trouvés chez l'homme, SPCA1 et SPCA2 (codés par les gènes ATP2C1 et ATP2C2). Ces protéines sont localisées dans l'appareil de Golgi; elles transportent le Ca^{2+} et le Mn^{2+} . Les SPCAs et les SERCAs appartiennent toutes, comme d'ailleurs les PMCAs, à ce que l'on appelle la famille des ATPases de type P (voir plus loin). En revanche, tout comme PMCA, SPCA ne présente qu'un seul site de fixation pour le Ca^{2+} (correspondant au site II de SERCA, voir plus loin). SPCA transporte le Ca^{2+} avec la même affinité que SERCA et transporte le Mn^{2+} avec une forte affinité. SPCA n'est pas inhibée par la thapsigargine, un inhibiteur de la fixation de calcium pour SERCA. L'alignement des séquences de SERCA, SPCA1 et SPCA2 (Figure 6 dans (Wuytack et al. 2002)) montre que les résidus réputés être importants pour l'effet inhibiteur de la TG sur SERCA (Xu et al. 2004) sont absents chez SPCA: les résidus F256 et I765 sont remplacés par des leucines, et Y837 est remplacé par une isoleucine. Cette propriété a été largement utilisée pour discriminer SERCA et SPCA dans des études de localisation cellulaire ou des études fonctionnelles.

Tout comme la mitochondrie, l'appareil de Golgi semble avoir un rôle important pour la forme des oscillations calciques car il permet lui aussi de moduler la concentration de Ca^{2+} cytosolique. Chez la levure, une augmentation de Mn^{2+} peut être toxique pour la cellule, ce qui donne à PMR1 le rôle important de permettre le reflux de Mn^{2+} à l'extérieur de la cellule, via la fusion avec la membrane plasmique des vésicules sécrétoires. De manière plus générale, le Ca^{2+} et le Mn^{2+} ont dans l'appareil de Golgi des rôles spécifiques, pour le trafic des protéines membranaires et pour les réactions de *N*- et *O*-glycosylation, respectivement. Le rôle de PMR1 et de SPCA est donc crucial pour cette glycosylation (Wuytack et al. 2002). L'inactivation d'un des allèles de ATP2C1 (qui code pour SPCA1) conduit à une maladie autosomale dominante appelée syndrome de Hailey-Hailey (Hu et al. 2000; Sudbrak et al. 2000). Ce syndrome conduit à des désordres dermatologiques que l'on suppose dus à des défauts de glycosylation de protéines liées à l'adhésion entre elles des cellules de l'épiderme (par exemple les glycoprotéines du desmosome). Il est d'ailleurs assez curieux de constater que les troubles ne soient observés qu'au niveau de la peau, alors que les SPCA sont exprimées dans de très nombreux tissus.

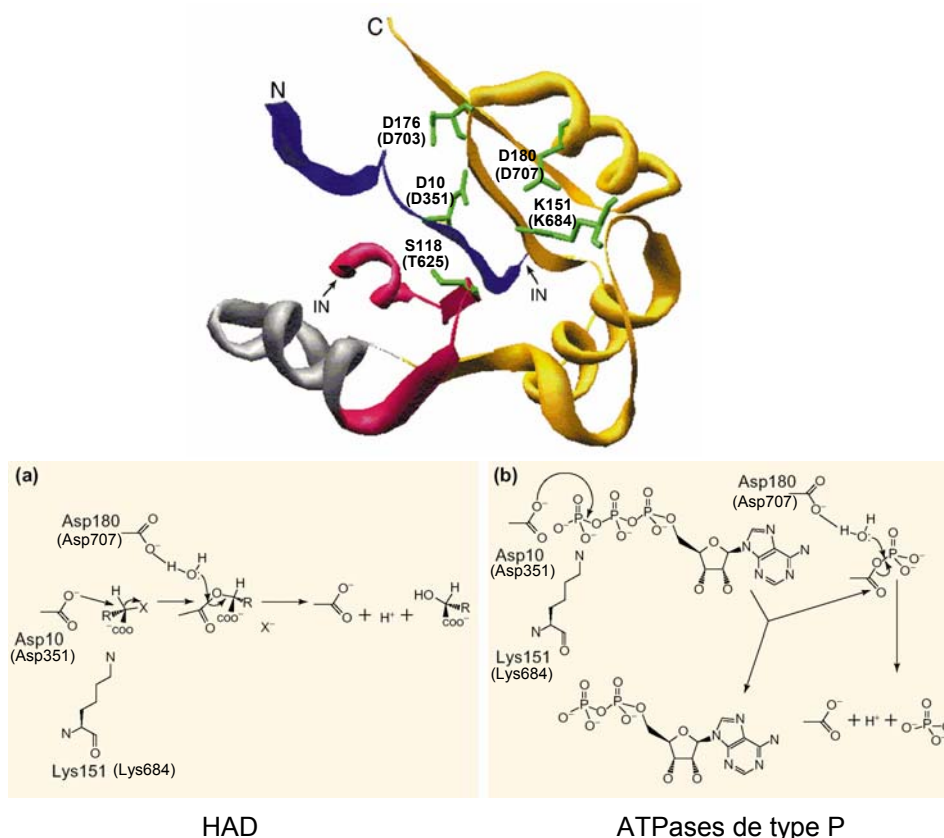
Le transport de Ca^{2+} vers le réticulum endoplasmique, enfin, fait intervenir une classe de protéines appelées SERCAs, qui vont être décrites plus en détail dans le paragraphe suivant.

4. Les pompes à calcium présentes sur la membrane du réticulum endoplasmique : les « SERCAs », des ATPases « de type P »

Les ATPases- Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (ou SERCAs, pour Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPases) sont des protéines membranaires catalysant le transport de Ca^{2+} du cytoplasme vers l'intérieur du réticulum endoplasmique (cf Figure 1 plus haut), y compris dans le muscle où le réticulum endoplasmique est la source principale du calcium responsable de la contraction musculaire (dans ce tissu, on l'appelle réticulum « sarcoplasmique »). L'accumulation préalable de ce calcium nécessite un apport d'énergie, sous forme d'hydrolyse d'ATP, car le transport se fait contre un gradient de concentration. Nous reviendrons en détail sur le fonctionnement de l'ATPase- Ca^{2+} au chapitre suivant. Mentionnons ici seulement que la protéine, ayant fixé l'ATP, subit au cours de son cycle catalytique une autophosphorylation sur un résidu aspartate. Cette autophosphorylation a lieu au niveau d'une séquence consensus invariante dans les diverses SERCAs (séquence DKTGT). Cela fait de cette pompe un membre de la famille des ATPases « de type P », famille qui contient aussi, comme on l'a dit, PMCA et SCPA. Les diverses ATPases de cette famille catalysent le transport de molécules chargées dans de nombreux organismes, et permettent des processus physiologiques très variés (Møller et al. 1996): création du potentiel d'action dans le tissu nerveux (pompe Na^+, K^+), acidification de l'estomac (pompe H^+, K^+), absorption secondaire des nutriments (pompes Na^+, K^+ et H^+, K^+), relaxation musculaire (SERCA), signalisation calcique (SERCA, PMCA), détoxification et/ou contrôle de cofacteurs métalliques lourds (ATPases de type P_1), etc ...

Cet arbre phylogénétique (Figure 2) fait apparaître les parentés entre ATPases issues d'organismes divers. Une ATPase transportant un substrat donné est toujours génétiquement plus proche d'une ATPase transportant le même substrat (même si cette ATPase est issue d'un organisme très différent) que d'une ATPase du même organisme mais transportant un substrat différent. Il a été suggéré que toutes les ATPases de type P dérivent d'une protéine ancestrale de type P₁ (Axelsen and Palmgren 1998; Palmgren and Axelsen 1998) et (Møller et al. 1996). Axelsen et Palmgren (Axelsen and Palmgren 1998) suggèrent que cette ATPase ancestrale est probablement l'ATPase KdpB (voir Figure 2). En effet, KdpB a pour particularité d'avoir un nombre de segments transmembranaire réduit par rapport aux autres ATPases de type P (Lutsenko and Kaplan 1995). De plus, pour que KdpB, puisse fonctionner, deux autres sous-unités doivent être présentes: KdpA, responsable de la fixation du K⁺, et KdpC, nécessaire à la stabilisation du complexe KdpABC. Les ATPases de différents types auraient évolué à partir de cette ATPase primitive par acquisition de nouveaux segments transmembranaires et fusion des domaines KdpB et KdpA. La sous unité β des pompes Na⁺,K⁺ et H⁺,K⁺ serait la réminiscence de la sous-unité KdpC, alors que les ATPase-Ca²⁺ et ATPase-H⁺, postérieures aux pompes Na⁺,K⁺ et H⁺,K⁺, auraient perdu cette sous unité.

En 1998, Aravind et collaborateurs ont montré que les ATPases de type P appartenaient à une superfamille de protéines à activité « hydrolase » (Aravind et al. 1998). Cette superfamille a été baptisée superfamille HAD, du nom de la L-2-haloacid dehalogenase (HAD, isolée de *Pseudomonas* sp.), membre de cette superfamille dont la structure tridimensionnelle avait été déterminée par cristallographie des rayons X (Hisano et al. 1996).



Les différentes protéines de cette superfamille contiennent trois motifs bien conservés. Il a été jugé vraisemblable que les ATPases de type P partagent un mécanisme catalytique commun avec les protéines de type HAD (plusieurs d'entre elles possèdent d'ailleurs une activité phosphatase): le modèle structural type du domaine catalytique des protéines HAD a donc été proposé pour les ATPases de type P, avec ses résidus conservés pour protéines HAD et ATPases de type P: voir

Figure 3 panneau du haut). Ceci a permis un grand pas en avant pour la compréhension du mécanisme d'autophosphorylation des ATPases de type P (voir

Figure 3 panneau du bas).

Mentionnons au passage, cependant, que lorsque les structures à haute résolution de différentes conformations de SERCA1a (l'ATPase de type P qui est notre objet d'étude) ont été finalement déterminées (cf chapitre suivant), elles ont contredit la proposition faite par Aravind et collaborateurs pour le mécanisme de la déphosphorylation (cf. Figure 3), sans doute parce que l'autre motif conservé dans la famille des ATPases de type P (mais pas dans la famille HAD), le motif « TGES », important pour la déphosphorylation, avait été oublié dans cette proposition de mécanisme catalytique par Aravind et al....

4.2. les différentes SERCAs: isoformes, localisations, implication lors de dysfonctionnements pathologiques

Le présent travail de thèse porte sur le représentant le mieux connu de ces ATPases de type P, l'ATPase- Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique de muscle squelettique (SERCA1a). Mais avant de rentrer plus avant dans l'étude fonctionnelle de cette protéine, je présenterai ici quelques caractéristiques des diverses autres isoformes de SERCA. Si toutes ont des similitudes structurales et fonctionnelles, leur localisations tissulaires et leur spécificités physiologiques varient (Lyttton et al. 1992). Pour chacune des ATPases présentées, on attirera aussi l'attention sur les différentes pathologies associées à leur dysfonctionnement.

4.2.1. SERCA1

La protéine SERCA1 présente deux isoformes: SERCA1a et SERCA1b. Ces deux isoformes résultent de l'épissage alternatif du transcrit du gène ATP2A1, épissage impliquant la partie C-terminale de la protéine: SERCA1a (forme adulte) possède 994 acides aminés alors que SERCA1b (forme néonatale) compte 1001 acides aminés. L'implication physiologique de cette différence est à l'heure actuelle mal connue. De par sa relative facilité d'extraction et de purification à partir de muscle squelettique, l'isoforme SERCA1a est devenue une protéine membranaire modèle, et elle fait figure d'archétype des ATPases de type P. SERCA1a est aussi la première ATPase de type P à avoir été clonée (Brandl et al. 1986), et la première pour laquelle des structures tridimensionnelles à haute résolution de différents intermédiaires réactionnels ont été déterminées par cristallographie aux rayons X (Toyoshima et al. 2000; Toyoshima and Nomura 2002; Olesen et al. 2004; Sørensen et al. 2004b; Toyoshima and Mizutani 2004; Toyoshima et al. 2004).

L'isoforme SERCA1a de l'ATPase- Ca^{2+} est, de très loin, la protéine la plus abondante dans les membranes de réticulum endoplasmique (sarcoplasmique) de la fibre musculaire à contraction rapide. Le réticulum forme dans cette fibre un réseau membranaire extrêmement développé, qui en certains points de la cellule (les « triades ») se retrouve à la proximité immédiate d'invaginations tubulaires de la membrane plasmique (les « tubules T »). C'est jusqu'au niveau de ces tubules T que, lors d'une contraction musculaire, se propage l'influx nerveux parcourant la membrane plasmique.

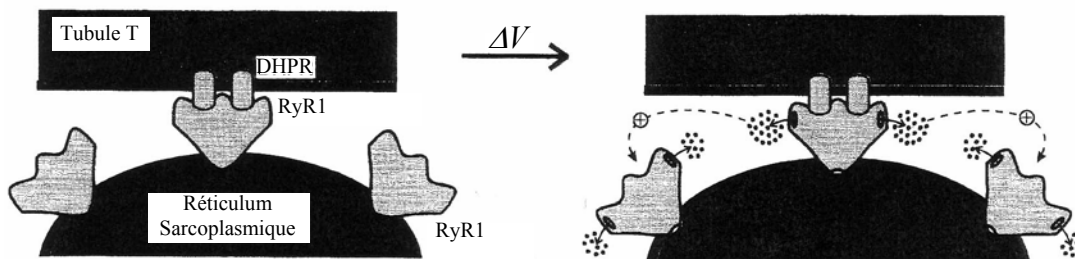


Figure 4. Libération de calcium du réticulum sarcoplasmique dans le muscle squelettique adapté de (Berridge 1997)

Lors d'une contraction musculaire dans un muscle squelettique à contraction rapide, la variation du potentiel de membrane (plasmique) va induire un changement de conformation, sur le tubule T, d'une protéine-canal qui est aussi le récepteur à la dihydropyridine (DHPR). Mais cette protéine du tubule T est associée très étroitement (*via* des structures denses aux électrons, les « pieds », que l'on peut voir en microscopie électronique) aux protéines qui lui font face sur la membrane du réticulum (Figure 4). Parmi celles-ci, le récepteur à la ryanodine (de type 1 dans le muscle rapide), RYR1: le changement de conformation du DHPR va induire « mécaniquement » l'ouverture du canal calcium associé au RYR1 qui lui fait face, et donc la libération de Ca^{2+} vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme, ce calcium va pouvoir activer des récepteurs à la Ryanodine voisins, d'où amplification de l'effet initial, et finalement se fixer à la troponine C pour lever l'inhibition qu'exerçait cette dernière sur l'interaction entre actine et myosine : la contraction musculaire peut donc avoir lieu.

A l'inverse, pour que la relaxation musculaire puisse être réalisée, il faut que le calcium regagne la lumière du réticulum sarcoplasmique ; ce repompage est réalisé par l'ATPase- Ca^{2+} . Nous reviendrons sur les mécanismes de ce repompage en détail dans la deuxième partie de ce chapitre.

Des mutations du gène ATP2A1, donc des modifications de la protéine SERCA1a, conduisent à un syndrome autosomal récessif appelé syndrome de Brody. Ce dysfonctionnement génétique rare est caractérisé par le développement de contractures musculaires non douloureuses pendant l'effort (Brody 1969). Leur explication réside sans doute dans le ralentissement de la relaxation musculaire causé par la diminution de l'activité de transport de SERCA1a (MacLennan 2000; Odermatt et al. 2000). Mais dans certains cas, la mutation de ATP2A1 conduit à une perte quasi-totale de l'expression de SERCA1a. L'extrême abondance de SERCA1a dans le muscle à contraction rapide sain et le rôle majeur qu'elle y joue normalement rendent alors paradoxal le fait que les signes cliniques du syndrome de Brody soient souvent bénins, voire non diagnostiqués, et compatibles avec une vie normale. Ceci est probablement dû à des phénomènes compensatoires non encore caractérisés.

4.2.2. SERCA2

SERCA2 est elle aussi présente sous la forme de deux isoformes: SERCA2a (997 acides aminés) et SERCA2b (1042 acides aminés), formées après épissage alternatif du transcrit du gène ATP2A2. SERCA2a est retrouvée de manière prépondérante dans le muscle cardiaque et dans les muscles à contraction lente alors que SERCA2b est retrouvée dans le muscle lisse et dans des cellules non musculaires. SERCA2b est d'ailleurs considérée comme étant une isoforme ubiquitaire (« house-keeping »).

SERCA2a. L'isoforme SERCA2a est impliquée dans la relaxation du muscle cardiaque. Comme dans le cas du muscle squelettique, la contraction cardiaque repose sur le couplage entre dépolarisation de membrane plasmique et ouverture des canaux présents sur

les membranes internes de réticulum. Toutefois le mécanisme est ici un peu plus sophistiqué. En effet il n'existe pas de couplage direct entre récepteur à la dihydropyridine et récepteur à la Ryanodine (isoforme de type 2 dans le cœur) : mais le récepteur à la dihydropyridine (DHPR) sensible au potentiel étant un canal calcium, la dépolarisation à la surface de la membrane permet l'ouverture de ce canal DHPR, et c'est l'entrée de calcium via le DHPR qui va pouvoir à son tour ouvrir les canaux RyR2, par le mécanisme de CICR déjà évoqué (Figure 4). SERCA2a, quant à lui, joue le rôle principal pour la *relaxation* du muscle cardiaque, en repompant dans la lumière du réticulum le calcium qui a servi à la contraction.

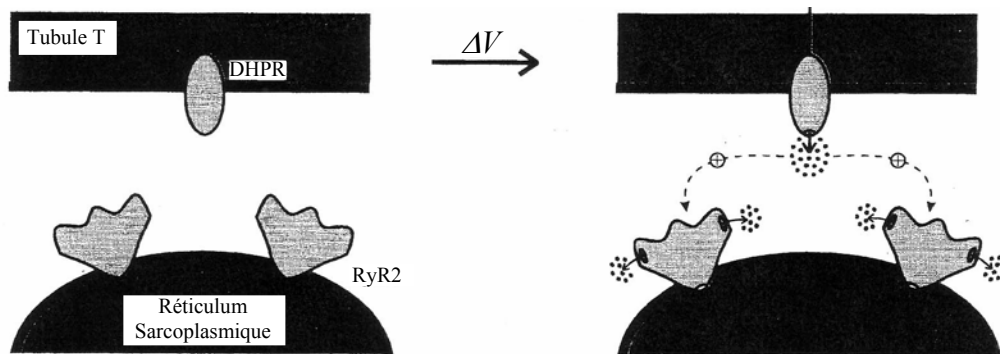


Figure 5. Libération de calcium du réticulum sarcoplasmique dans le muscle cardiaque adapté de (Berridge 1997)

Le fonctionnement de SERCA2a est régulé par une petite protéine membranaire appelée phospholamban, une protéine de 52 acides aminés (6080 Da) principalement trouvée dans le réticulum sarcoplasmique des cellules cardiaques. Sous sa forme non phosphorylée, le phospholamban joue un rôle d'inhibiteur endogène, en diminuant l'affinité apparente de l'ATPase pour le calcium sans avoir d'effet sur la vitesse maximale d'hydrolyse de la pompe: aux concentrations physiologiques de calcium, la présence de phospholamban non phosphorylé diminue donc l'activité de SERCA2a. Mais la phosphorylation de cette petite protéine libère SERCA2a de son inhibition. L'équilibre entre forme non inhibitrice et forme inhibitrice de phospholamban est régulé par la phosphorylation ou la déphosphorylation de phospholamban, *via* la protéine kinase dépendant de l'AMPc ou du GMPc ou la protéine Kinase II Ca^{2+} / calmoduline dépendante (CaMKII).

La présence du phospholamban permet à une cellule cardiaque de pouvoir moduler sa « contractilité », c'est à dire sa capacité à se contracter plus ou moins suivant les conditions: dans des conditions basales, le phospholamban non phosphorylé inhibe l'ATPase, le réticulum endoplasmique se charge donc moins en calcium, et cela imposera une contraction plus faible au battement cardiaque suivant. A l'inverse, quand le phospholamban est phosphorylé, et le pompage de calcium par SERCA2a plus actif, la force de contraction sera potentiellement plus forte: c'est ce qui se passe lors de la stimulation « inotropique » par des récepteurs β adrénergiques (Tada and Katz 1982).

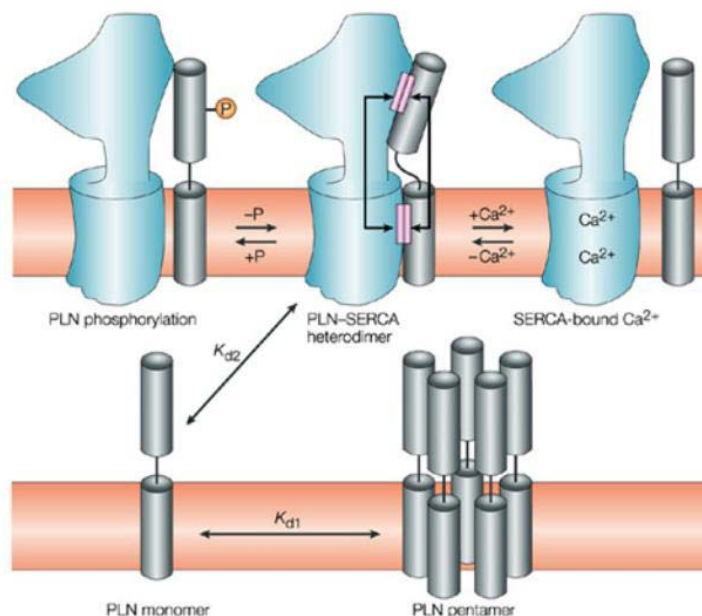


Figure 6. Réversibilité de l'inhibition de SERCA2a par le phospholamban d'après (MacLennan and Kranias 2003)

Phospholamban a aussi une propension naturelle à l'homo-pentamérisation (grâce à la formation de structures Leucine-Zipper au niveau des régions transmembranaires), dont le rôle a été beaucoup discuté. La structure de la forme pentamérique non phosphorylée du phospholamban, déterminée récemment par RMN (Oxenoid and Chou 2005), a été jugée cohérente avec une architecture de type canal, ce qui renforcerait l'idée parfois avancée que le phospholamban pourrait jouer également un rôle de pore pour la rétrodiffusion du calcium (Oxenoid et Chou suggèrent aussi que ce canal puisse laisser passer les ions chlores, afin de maintenir l'électroneutralité).

La forme inhibitrice du phospholamban serait sa forme monomérique (non phosphorylée). Le monomère se fixerait préférentiellement sur l'une des conformations de SERCA, sa conformation « E2 » (voir plus loin) dépourvue de Ca^{2+} , ce qui aurait pour effet d'abaisser l'affinité apparente de l'enzyme pour le Ca^{2+} .

Notons que le phospholamban n'est pas exprimé dans le muscle à contraction rapide. Mais la coexpression artificielle de phospholamban avec SERCA1a dans un système hétérologue inhibe bien également SERCA1a. Par ailleurs, dans le muscle à contraction rapide, une protéine de 31 acides aminés appelée sarcolipine, qui a une certaine homologie de séquence avec le phospholamban au niveau de ses parties transmembranaires (Odermatt et al. 1997; Odermatt et al. 1998), joue apparemment un rôle semblable. La sarcolipine est une protéine transmembranaire dont plus de la moitié de la séquence est composée de résidus hydrophobes. Ceci explique sa grande solubilité dans les solvants organiques et dans les phases lipidiques (d'où son nom; elle était auparavant connue sous le nom de « protéolipide » du SR) (Wawrzynow et al. 1992). La sarcolipine est décrite comme étant la protéine régulatrice principale dans le muscle à contraction rapide, mais elle est aussi exprimée dans le muscle à contraction lente et, dans une moindre mesure, dans le muscle cardiaque. Lorsqu'elles sont co-exprimées, sarcolipine et phospholamban semblent avoir une activité synergique : il y a « super inhibition ». Comme le phospholamban, la sarcolipine diminue le K_m de l'ATPase pour le calcium ; en revanche, elle ne possède pas la même capacité naturelle à la pentamérisation; elle n'est d'ailleurs pas non plus régulée par des réactions de phosphorylation: il semblerait que l'effet de la sarcolipine ne soit modulé que par son niveau d'expression.

SERCA2b. *SERCA2b* a une affinité apparente pour le Ca^{2+} deux fois meilleure que *SERCA2a*, mais un « turnover » deux fois moindre. La différence d'affinité apparente pour le calcium entre les deux isoformes a été attribuée par Camacho et al. à l'interaction des 12 acides aminés C-terminaux de *SERCA2b* avec la calréticuline, une protéine soluble de la lumière du réticulum endoplasmique (John et al. 1998).

Chez l'homme, certaines mutations du gène *ATP2A2* conduisent au syndrome de Darier, qui est une pathologie autosomale dominante aboutissant à des désordres dermatologiques et, chez quelques patients, à des troubles neuro-psychiatriques. *SERCA2b* est abondamment exprimée dans les kératinocytes. Le syndrome de Darier conduit à une diminution de l'expression de *SERCA2b* et donc à une élévation de la concentration en calcium dans certaines circonstances, puis à une fragmentation des filaments de kératine qui connectent les cellules suprabasales de l'épiderme, compromettant ainsi leur adhésion (Carafoli 2004). Les mutations qui, chez l'homme, sont responsables du syndrome de Darier, aboutissent, chez la souris, à des phénotypes tumoraux (Prasad et al. 2005).

D'autres pathologies humaines semblent associées à des défauts de fonctionnement de *SERCA2*. Une corrélation inverse significative a été décrite entre le niveau d'expression de *SERCA2b* et le taux de croissance des cellules tumorales dans le cancer de la prostate (Legrand et al. 2001). De plus la perte d'un des deux allèles du gène *ATP2A2* a de multiples conséquences sur le plan cardiaque (Periasamy et al. 1999), (Brittsan and Kranias 2000), (Kiriazis and Kranias 2000), (Ji et al. 2000), (Kirby et al. 1992)).

4.2.3. SERCA3

SERCA3 est l'isoforme la plus récemment découverte (Burk et al. 1989), c'est aussi la moins bien connue. Elle a pour particularité d'avoir une affinité apparente pour le calcium cinq fois plus faible que *SERCA1* et *SERCA2a* (réduction de la vitesse apparente de fixation et augmentation de la vitesse de dissociation, voir (Dode et al. 2002)), et de fonctionner à des pH significativement plus hauts (Lytton et al. 1992). *SERCA3* serait insensible au phospholamban (Lytton et al. 1992; Martin et al. 2002). Cinq variants d'épissage, ne différant que par leur extrémité C terminale, ont été décrits.

SERCA3 a une distribution tissulaire assez large et, si elle est pratiquement toujours co-exprimée avec l'isoforme *SERCA2b*, son rôle spécifique commence à être décrit dans certains tissus. Par exemple il semblerait que *SERCA3* soit à l'origine de dérégulations dans la sécrétion d'insuline dans les cellules β pancréatiques (Varadi et al. 1996; Jonas et al. 1999; Varadi et al. 1999; Xu et al. 2000; Arredouani et al. 2002) et que cette isoforme soit spécifiquement exprimée dans des cas de cancer du colon (Gelebart et al. 2002; Brouland et al. 2005).

4.2.4. Addendum : SERCA et la malaria

L'analyse du génome des organismes invertébrés révèle que la grande majorité d'entre eux possède un seul gène codant pour *SERCA*, assez proche du gène *ATP2A2* codant pour l'isoforme *SERCA2*. De façon inattendue, chez le parasite responsable du paludisme, le produit de ce gène s'est révélé être une cible possible de la lutte contre cette parasitose.

La malaria (autre nom du paludisme) est un fléau dans les pays du tiers monde et dans les pays en voie de développement, tuant un million de personnes et en contaminant 500 millions par an. La plupart des victimes sont âgées de moins de cinq ans et vivent majoritairement en Afrique sub-saharienne mais aussi en Asie du Sud Est, en Amérique du Sud et dans le sous-continent Indien. Cette maladie est due à un parasite (un protozoaire, dont les espèces les plus communes sont *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*), qui

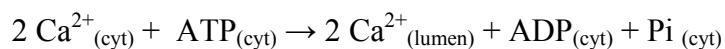
envahit le foie et s'y réplique avant d'envahir et de détruire les globules rouges. Le vecteur du parasite est un moustique dont la propagation est difficilement contrôlable. De plus des phénomènes de résistance sont apparues contre les traitements de cette parasitose les plus couramment utilisés à l'heure actuelle, chloroquine et sulphadoxine-pyriméthamine. De grands espoirs résident dans l'utilisation d'une classe de molécules, les artémisinines, dont l'efficacité est utilisée depuis le troisième siècle (les moines taoïstes utilisaient des préparations à base d'armoise amère (*Artemisia annua*) ou qinghao pour soigner des fièvres apparentées à la malaria), et dont les capacités à détruire le parasite sont activement étudiées depuis les années 70. L'efficacité de l'artémisinine contre le parasite a longtemps été attribuée à la toxicité des radicaux libres dont elle catalyse la libération en présence de Fe^{2+} , et à sa présence à forte concentration à l'intérieur de ce qui avait été considéré être les vacuoles digestives du parasite, particulièrement riches en hème (et donc en fer) puisque le parasite ingère et dégrade jusqu'à 80 % de l'hémoglobine du globule rouge qui l'héberge (Ridley 2003). Toutefois, il a été décrit récemment (Eckstein-Ludwig et al. 2003) que le mécanisme d'action de l'artémisinine reposait plutôt sur sa capacité à inhiber spécifiquement l'ATPase- Ca^{2+} de ce parasite, la PfATP6. Cette dernière hypothèse est basée sur des techniques de localisation in vivo et sur la spécificité d'action de l'artémisinine et de ses dérivés sur l'ATPase du parasite. Par la suite, il a été montré qu'un résidu bien particulier de PfATP6 était critique pour l'action de l'artémisinine (Uhlemann et al. 2005) : la mutation ponctuelle de ce résidu dans PfATP6 empêche l'interaction entre l'artémisinine et l'ATPase. Cette étude suggère un mode d'action de l'artémisinine à un niveau moléculaire qui met à mal la théorie qui prévalait jusqu'alors. Des mécanismes de résistance n'ont pour l'heure pas encore été décrits. L'utilisation de l'artémisinine souffre cependant de quelques inconvénients : problèmes de synthèse chimique (pureté et coûts), problèmes de biodisponibilité et de pharmacocinétique limitante, et problèmes thérapeutiques (incompatibilité avec des traitements longs et problèmes de recrudescence) ; un dérivé synthétique a cependant récemment été décrit comme autre candidat potentiel contre la malaria (Vennerstrom et al. 2004). Ces résultats suggèrent des retombées médicales particulièrement intéressantes de l'étude des SERCAs.

II. Fonctionnement de SERCA1a

La compréhension du mécanisme de transport actif de Ca^{2+} par SERCA1a bénéficie d'une quantité impressionnante de publications. Depuis le début des années 60, le fonctionnement de l'ATPase a été disséqué au moyen de techniques très variées (pour revue: (de Meis and Vianna 1979; Andersen 1995; Champeil 1996; Møller et al. 1996; Jencks 1997; MacLennan et al. 1997) pour les aspects fonctionnels, (Kühlbrandt 2004; Toyoshima and Inesi 2004; Møller et al. 2005) pour les aspects structuraux). Pour certains de ces travaux, l'ATPase- Ca^{2+} a bénéficié des résultats déjà acquis pour l'ATPase- Na^+, K^+ , pour d'autres l'inverse a été vrai. Les résultats de toutes ces études ont abouti à une vision provisoire assez cohérente de la façon dont l'ATPase transporte le Ca^{2+} , et à l'établissement d'un quasi-consensus dans la description du cycle catalytique de l'enzyme. L'essor de la biologie moléculaire a également permis quelques propositions précises quant aux résidus impliqués dans les différentes étapes de ce transport. Il est désormais possible et particulièrement intéressant de confronter tous ces résultats avec les structures à haute résolution obtenues récemment par cristallographie des rayons X pour l'ATPase sous différentes conformations (Toyoshima et al. 2000; Toyoshima and Nomura 2002; Olesen et al. 2004; Sørensen et al. 2004b; Toyoshima and Mizutani 2004; Toyoshima et al. 2004; Obara et al. 2005). Certaines de ces comparaisons témoignent de la qualité des propositions faites précédemment, d'autres soulèvent encore quelques interrogations.

1. Cycle catalytique global

L'isoforme SERCA1a possède l'avantage d'être particulièrement abondante dans les membranes du réticulum sarcoplasmique (SR) du muscle à contraction rapide, et différents protocoles permettant d'isoler des microsomes de SR à partir de muscle de lapin ont été décrits (Hasselbach and Makinose 1961; de Meis and Hasselbach 1971; Eletr and Inesi 1972; Champeil et al. 1978). Des mesures de fixation et de transport de ligands radioactifs ont initialement permis de mettre en évidence le transport actif de Ca^{2+} , contre son gradient de concentration, à l'intérieur de vésicules de réticulum sarcoplasmique (Hasselbach and Makinose 1961; Ebashi and Lipmann 1962). Quelques années plus tard, la stœchiométrie de 2 Ca^{2+} pour un ATP hydrolysé était établie (Hasselbach and Makinose 1963), de même que le passage par un intermédiaire autophosphorylé (Yamamoto and Tonomura 1968). La réaction générale a donc pu être définie ainsi:



Différentes approches ont montré que l'autophosphorylation avait lieu au niveau d'un acide aspartique. Ce résultat fut d'abord proposé pour la pompe Na^+, K^+ par Robert Post et collaborateurs (Post and Kume 1973), puis pour l'ATPase Ca^{2+} sur la base de la similitude apparente des sites de phosphorylation de l'ATPase Ca^{2+} et de l'ATPase Na^+, K^+ (Bastide et al. 1973). Dans le même temps, Degani et Boyer arrivaient à la même conclusion par caractérisation chimique (Degani and Boyer 1973). En 1976, Allen et Green isolaient un fragment de 31 acides aminés contenant ce site de phosphorylation (Allen and Green 1976).

Une étape supplémentaire fut accomplie quand il fut montré que la réaction de transport était réversible : en présence d'ADP et de Pi , des vésicules préalablement chargées en Ca^{2+} relarguent leur calcium de l'intérieur vers l'extérieur de la vésicule (Barlogie et al. 1971), et cet efflux de Ca^{2+} est couplé à la formation d'ATP (Makinose 1971) avec la même stœchiométrie de 2 Ca^{2+} pour un ATP (Makinose and Hasselbach 1971), comme pour l'accumulation de calcium. La détermination de la séquence des événements permet

l'établissement d'un premier cycle catalytique: on y voit le transport de calcium se faire après transfert du groupement phosphate de l'ATP au résidu aspartique, mais avant la déphosphorylation (Makinose 1973)(Figure 7).

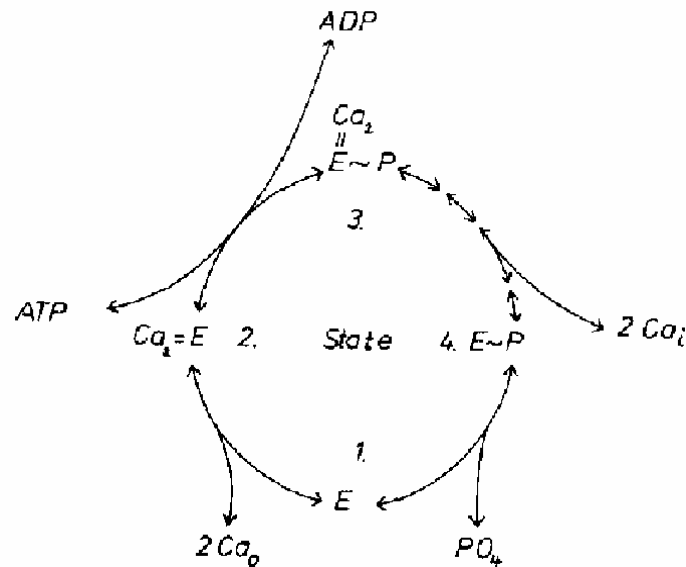


Figure 7. Cycle catalytique de l'ATPase Ca^{2+} , d'après (Makinose 1973)

Un peu plus tard, on a considéré que les deux formes principales de l'ATPase phosphorylée se distinguaient par leur capacité ou leur incapacité à réagir avec l'ADP pour former de l'ATP. Ces formes ont été nommées respectivement $E1P$ et $E2P$, selon une nomenclature héritée de l'ATPase Na^+, K^+ (Shigekawa and Dougherty 1978b; a; Shigekawa et al. 1978). Au contraire de la forme $E1P$, la forme $E2P$ a été dite « de basse énergie ». Sur la base de différents résultats, une version plus détaillée du cycle catalytique, inspirée du modèle « Post-Albers » suggéré pour l'ATPase Na^+, K^+ (Albers 1967; Post et al. 1972), a considéré que les deux conformations majeures adoptées par l'enzyme, $E1$ et $E2$, ou encore E et E^* , étaient associées non seulement à des réactivités chimiques différentes au niveau du site catalytique mais aussi à des orientations différentes pour les sites Ca^{2+} , ouverts vers le côté cytosolique ou vers le côté luminal, respectivement (de Meis and Vianna 1979). Il est également apparu qu'entre ces deux conformations, l'enzyme adoptait des états dans lequel l'ion transporté n'était accessible ni d'un côté ni de l'autre de la membrane, des états « occlus ». Ce schéma réactualisé est à l'heure actuelle probablement toujours valable pour l'essentiel (Figure 8).

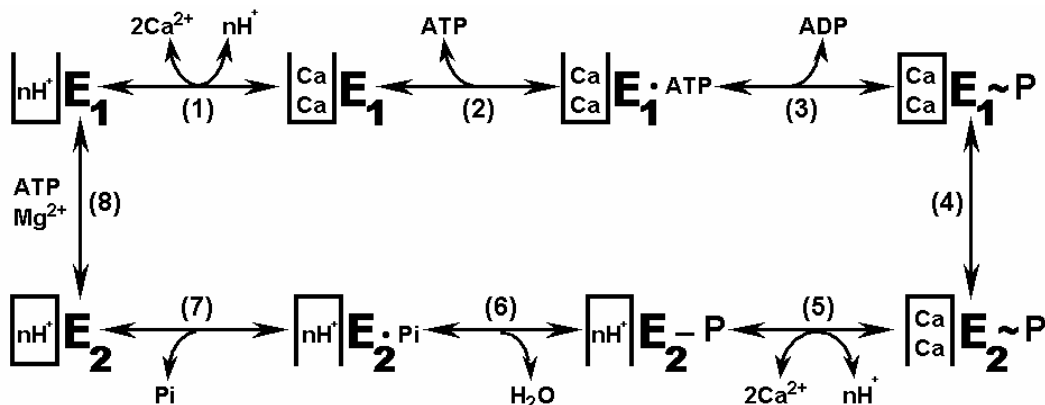


Figure 8. Cycle catalytique de l'ATPase Ca^{2+} , adapté de (de Meis and Vianna 1979; Wakabayashi et al. 1990; McIntosh et al. 1991; Forge et al. 1993b)

Ce modèle a toutefois des limites car il ne rend pas forcément compte de certains résultats expérimentaux (Jencks 1989). Ainsi, Inesi a suggéré que la forme E2 de l'ATPase était capable de fixer un premier ion Ca^{2+} , avec une relativement faible affinité, avant qu'un changement de conformation ne fasse apparaître la forme possédant une haute affinité pour la fixation du deuxième ion calcium (nous reviendrons sur cette suggestion plus loin). D'autres remettent en cause un modèle qui ne serait basé que sur des changements de conformations de l'ATPase (Scarborough 2003a; b). Enfin, force est de constater que dans des conditions physiologiques, la concentration en ATP dans la cellule est telle qu'il est bien improbable que le cycle passe par un intermédiaire dépourvu de nucléotide, puisqu'il est admis que la forme E2 a une affinité non négligeable pour l'ATP (Jensen et al., en préparation). Quoi qu'il en soit, le fonctionnement de l'ATPase continue à être décrit suivant ce modèle, car il permet de discuter la grande majorité des travaux.

2. Vers une description structurale de ce cycle ?

En 1985, MacLennan et collaborateurs franchissaient une étape décisive (MacLennan et al. 1985). En déterminant la séquence du gène codant pour SERCA, ils ouvraient notamment la voie à une série d'études par mutagenèse dirigée, pour caractériser les résidus impliqués dans les différentes étapes du cycle catalytique de l'enzyme. De plus, il devint possible de tenter de deviner la topologie locale de l'ATPase par l'analyse de sa séquence (MacLennan et al. 1985; Green and Stokes 1992; McIntosh 1998), et de prédire l'architecture générale de l'ATPase, avec notamment, pour cette protéine membranaire de 110 kDa, une large partie cytosolique et une partie transmembranaire constituée de 10 hélices α (classiquement appelées M1-M10).

Les premiers modèles structuraux de l'ATPase ont été obtenus par microscopie électronique de cristaux bidimensionnels obtenus en absence de Ca^{2+} mais en présence de décavanadate (Dux and Martonosi 1983). Les progrès concernant les conditions de cristallisation, les techniques de microscopie et les stratégies d'affinement des données structurales permirent des progrès significatifs dans la résolution des premières structures obtenues, de 25 Å (Taylor et al. 1986) à 14 Å (Toyoshima et al. 1993), puis enfin à 8 Å de résolution (Zhang et al. 1998), en présence de TG, un inhibiteur de la fixation de Ca^{2+} . Une étude ultérieure de cristaux obtenus à 9 Å de résolution apporta la première évidence structurale d'un changement de conformation important suite à la fixation des ions Ca^{2+} (Ogawa et al. 1998).

Toutefois, une véritable compréhension du fonctionnement de l'ATPase au niveau atomique n'est devenue possible qu'après la publication des structures à haute résolution des différentes conformations de l'enzyme, structures obtenues par diffraction des rayons X, à partir de cristaux tridimensionnels. La première structure à haute résolution de l'ATPase, obtenue en présence de Ca^{2+} , a été publiée en 2000 (Toyoshima et al. 2000). Ce travail eu un impact considérable au-delà du champ de l'ATPase- Ca^{2+} , en ouvrant la voie à la modélisation par homologie des ATPases de transport apparentées (pompe Na^+, K^+ (Sweadner and Donnet 2001; Jorgensen et al. 2003), pompe H^+, K^+ (Kühlbrandt et al. 2002; Radresa et al. 2002) ...). Cette première structure confirmait nombre des prédictions précédentes concernant l'agencement des domaines cytosoliques et membranaires, ainsi que la disposition des sites de fixation au sein de la membrane (Clarke et al. 1989). Elle suggérait aussi que des réorganisations de grande ampleur devaient nécessairement se produire aux différentes étapes du cycle catalytique, ce qu'ont confirmé les structures obtenues par la suite.

Dans un premier temps, nous présenterons l'architecture générale de l'ATPase en se basant sur la structure obtenue en présence de Ca^{2+} , puis nous évoquerons les différentes structures cristallographiques désormais disponibles. Mais pour chacune de ces structures, nous introduirons au préalable les résultats expérimentaux majeurs ayant trait à l'étape

catalytique que cette structure est censée aider à comprendre. Les six structures publiées à ce jour représentent, respectivement, l'enzyme en présence de Ca^{2+} (1SU4) (Toyoshima et al. 2000), en présence de Ca^{2+} et d'AMPPCP, un analogue non-hydrolysable de l'ATP (1TSS / 1VFP) (Sørensen et al. 2004b; Toyoshima and Mizutani 2004), en présence de Ca^{2+} , d'ADP et de fluoroaluminate, un complexe supposé mimer l'état de transition qu'occupe l'enzyme au moment de la phosphorylation (1T5T / 1WPE) (Sørensen et al. 2004b; Toyoshima et al. 2004), en absence de Ca^{2+} mais présence de fluoroaluminate, supposé mimer alors l'état de transition qu'occupe l'enzyme au moment de la déphosphorylation (1XP5) (Olesen et al. 2004), en absence de Ca^{2+} mais présence de fluorure de magnésium, supposé mimer la conformation qu'adopte l'enzyme complexée au phosphate après la déphosphorylation (1WPG) (Toyoshima et al. 2004), et enfin simplement en absence de Ca^{2+} (1IWO) (Toyoshima and Nomura 2002; Obara et al. 2005). Je décrirai ces structures (Figure 9) en suivant les étapes intermédiaires du cycle catalytique.

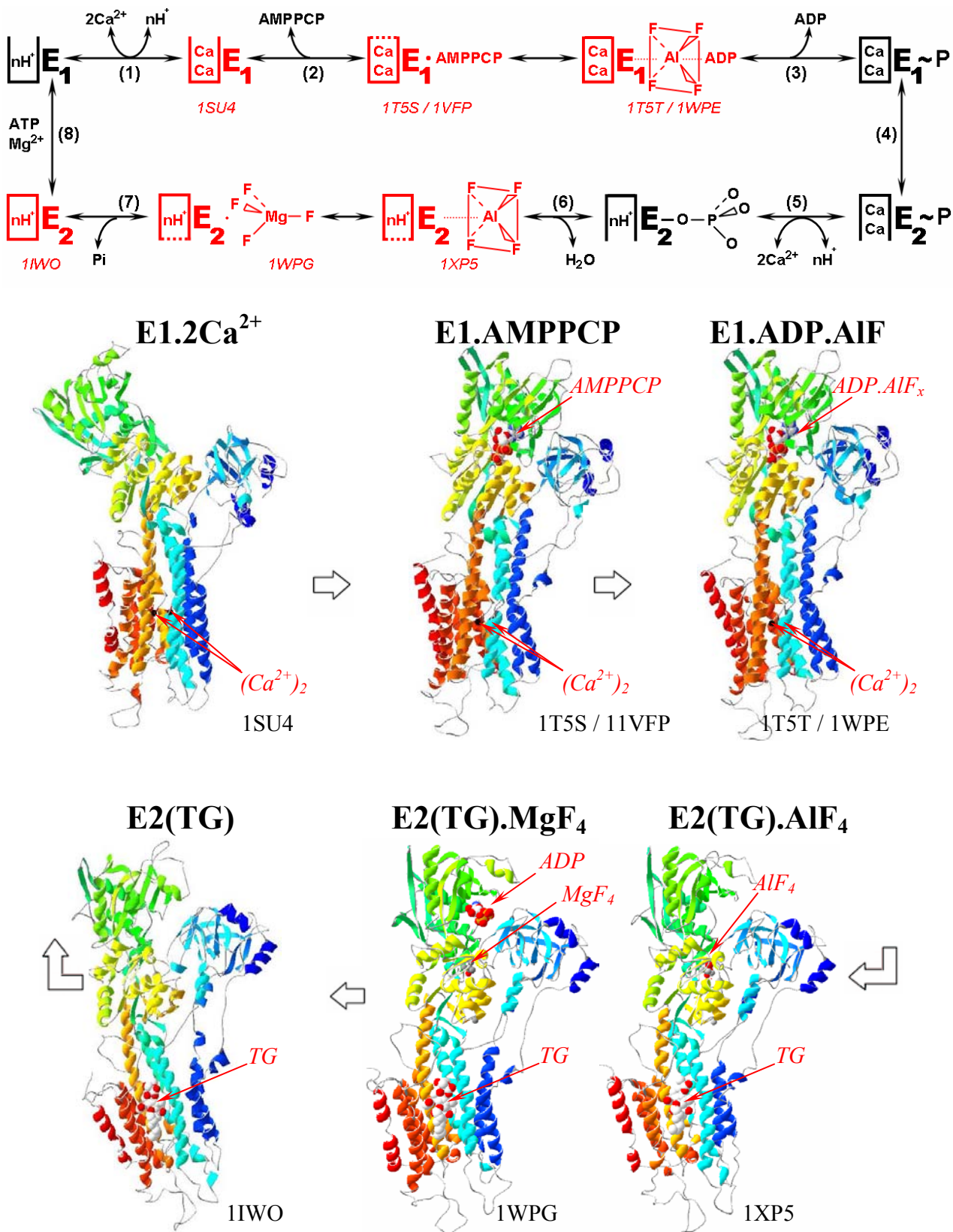


Figure 9. *En haut*: cycle catalytique de l'ATPase, d'après (de Meis and Vianna 1979), indiquant (en rouge) les différents intermédiaires dont les structures ont été décrites à l'heure actuelle.

Pour les formes E1.AMPGCP, E2.AIF₄ et E2.MgF₄, nous avons fermé les sites Ca²⁺ avec des pointillés car l'accessibilité des Ca²⁺ du côté cytosolique ou luminal est un sujet de controverse pour ces structures.

En bas: structures cristallographiques de l'ATPase déterminées par cristallographie des rayons X, structures éditées avec le programme Swiss-PDB Viewer

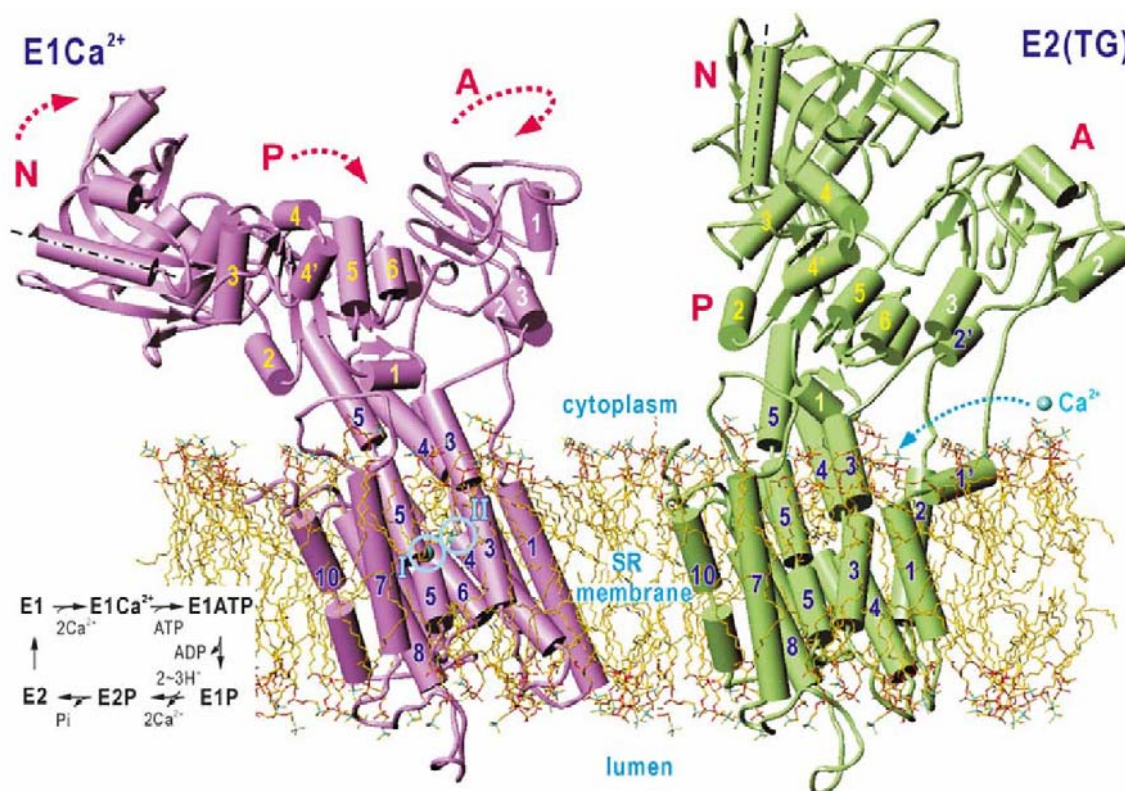


Figure 10. Structure cristallographique de SERCA en présence et en absence de Ca^{2+} , d'après (Toyoshima et al. 2003). NB : malgré ce que, par facilité, dit la légende en bas à gauche, ce sont bien deux ions Ca^{2+} qui sont fixés sur la forme « E1 », aux sites « I » et « II ».

3. Organisation générale de l'ATPase : structure de base E1Ca_2

Cette structure, obtenue en présence de Ca^{2+} (Figure 10, à gauche), a été publiée en 2000 (1EUL) et a fait l'objet d'une réactualisation un peu plus tard (1SU4). Les « dimensions » de l'ATPase y avoisinent 150 Å « de haut » et de 80 Å « de large ».

La partie cytosolique est constituée de trois domaines, appelés N (contenant le site de fixation du nucléotide), P (contenant le site de phosphorylation) et A (comme « Actuator »).

L'existence de domaines N et P distincts avait été pressentie à la suite d'expériences de protéolyse ménagée (Champeil et al. 1998), et surtout de comparaison de séquence avec la superfamille des protéines « HAD » (pour « haloacid déhalogenases ») (Aravind et al. 1998) dont la phosphosérine phosphatase est le représentant le mieux caractérisé, du moins d'un point de vue structural (Wang et al. 2002). Cette famille de protéines a d'ailleurs été d'une grande aide dans la prédiction de la structure du domaine P (Stokes and Green 2000). Il a même été suggéré que d'un point de vue évolutif, les ATPases de type P soient le résultat de la fusion d'une perméase transmembranaire et d'une phosphatase de la superfamille HAD (Aravind et al. 1998).

Avant même la détermination de la structure de l'ATPase en présence d'un analogue de nucléotide, il a été vérifié que le domaine N fixait son nucléotide à l'endroit attendu, c'est à dire au niveau du résidu Phe487 reconnu par mutagenèse dirigée comme critique pour la fixation de nucléotide (McIntosh et al. 1996). Ceci a été possible en incubant le cristal $\text{E1}(\text{Ca}^{2+})$ en présence d'un analogue de nucléotide (le TNP-AMP) et en déduisant la localisation de celui-ci de la différence entre densité électronique observée et densité électronique prédite pour la seule chaîne polypeptidique. Quelques années plus tard, le même résultat était obtenu par RMN du domaine N isolé de l'ATPase Na^+, K^+ (Hilge et al. 2003).

Le domaine P est constitué d'un feuillet à 7 brins β associés à huit courtes hélices α , structure classiquement décrite comme un « Rossmann fold » caractéristique des protéines fixant les nucléotides (Toyoshima et al. 2000), mais également présent dans les protéines de la superfamille des haloacides déhalogénases (HAD). L'organisation autour du site de phosphorylation de l'ATPase- Ca^{2+} des résidus qui sont bien conservés dans les autres ATPases de type P et la famille HAD se révèle semblable à leur organisation dans la structure de la phosphosérine phosphatase, confirmant la conservation des structures et pas seulement des séquences.

Le troisième domaine cytosolique révélé par cette première structure, le domaine A, a été une vraie surprise. C'est lui qui contient une autre séquence très conservée dans l'ensemble des ATPases de type P (mais pas dans la superfamille HAD), la séquence TGES. Dans cette structure, cette séquence est cependant positionnée de façon très périphérique, peu compatible a priori avec un quelconque rôle catalytique. Ce sont les structures suivantes qui révéleront le rôle très important joué par ce domaine après sa réorientation. Ce rôle est longtemps resté obscur, d'où ce nom un peu mystérieux d'« Actuator », mais il est maintenant clair que ce domaine joue un rôle pivot dans le contrôle de l'accessibilité des ions Ca^{2+} à leurs sites de fixation transmembranaires, ainsi que dans la déphosphorylation de l'enzyme.

Comme nous l'avons dit plus haut, l'aspartate phosphorylé au cours du cycle est contenu dans le domaine P, relativement loin du domaine N (25 Å environ) dans la structure E1Ca₂.

Dans cette structure, les trois domaines cytosoliques sont très éloignés les uns des autres. Cette caractéristique révèle la nécessité pour l'ATPase de subir de très grandes réorganisations conformationnelles lors de son fonctionnement, ne serait-ce que pour que le nucléotide puisse se retrouver à proximité de l'aspartate catalytique du domaine P au moment de la phosphorylation. Par ailleurs, il a été montré qu'en présence de calcium, l'ATPase peut réagir avec le glutaraldéhyde, un agent qui pontre les résidus Lys492 et Arg678, situés respectivement dans les domaines N et P (Ross and McIntosh 1987b; McIntosh 1992). Ceci implique que ces résidus doivent avoir la possibilité, ne serait-ce que de façon transitoire, d'être beaucoup plus proches que ne le suggère cette structure, et donc que les domaines cytosoliques sont très mobiles, la cristallisation ayant sélectionné une structure extrême. Le site de phosphorylation est également particulièrement éloigné des sites de fixation des ions Ca^{2+} (50 Å environ), ce qui met en avant la nécessité, pour le bon fonctionnement de l'enzyme, d'une communication à longue distance efficace entre domaines cytosoliques et domaine membranaire, malgré (ou grâce à) cette mobilité.

Il avait été suggéré très tôt que les sites de fixation du Ca^{2+} se trouvaient côte à côte, au sein du domaine transmembranaires (Clarke et al. 1989; Andersen 1995; MacLennan et al. 1997), et portés par des hélices α partiellement dépliées, au moins dans le cas de l'hélice M6 (Soulié et al. 1999). Ce résultat a été confirmé dans la structure E1Ca₂. Les sites de fixation des ions Ca^{2+} sont formés par les chaînes latérales et par les groupements carbonyles de résidus situés au sein des segments transmembranaires M4, M5, M6 et M8 (voir paragraphe suivant, fixation de calcium). L'hélice M4 est elle aussi significativement dépliée au niveau des résidus liés au calcium.

4. Fixation de calcium

L'étude de la fixation de Ca^{2+} sur l'ATPase a été bien sûr menée, historiquement, en utilisant un isotope radioactif du calcium, le $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Mais elle a été grandement facilitée par l'exploitation conjointe de méthodes spectroscopiques d'étude de la conformation de l'ATPase, notamment par l'observation des propriétés de fluorescence intrinsèque de l'ATPase: les changements de conformations induits par l'ajout de certains substrats (le Ca^{2+} , mais aussi les nucléotides, le phosphate inorganique ...) entraînent des changements spectroscopiques de faible amplitude relative, mais extrêmement reproductibles et raisonnablement faciles à mesurer (Champeil et al. 1976; Dupont 1976). L'ajout de concentrations croissantes de Ca^{2+} entraîne par exemple des variations de fluorescence permettant de déterminer l'affinité de l'enzyme pour le Ca^{2+} : celle-ci est micromolaire, voire submicromolaire à pH alcalin. On retrouve le même ordre de grandeur lorsqu'on étudie la dépendance en Ca^{2+} de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP.

Il est aussi possible de mesurer après mélange rapide *l'évolution dans le temps* de la fluorescence de l'ATPase mise en présence d'un ligand (Dupont and Leigh 1978): ceci donne par exemple accès aux caractéristiques cinétiques de la fixation de Ca^{2+} . De telles études ont permis de montrer que l'étape limitante pour la fixation des ions Ca^{2+} sur leurs sites n'était pas la réaction de fixation elle-même, mais un changement de conformation de l'enzyme (Dupont and Leigh 1978; Guillain et al. 1980). Le fait que cette fixation de Ca^{2+} puisse rester cinétiquement limitante dans les conditions de fonctionnement de l'ATPase a été démontré par l'observation que la vitesse de phosphorylation d'une enzyme préincubée en EGTA à laquelle on rajoute simultanément de l'ATP et du Ca^{2+} pouvait être plus lente que la vitesse de phosphorylation d'une enzyme préalablement incubée en présence de Ca^{2+} (Scofano et al. 1979).

S'il ne fait aucun doute que la fixation des ions Ca^{2+} est coopérative dans les conditions ordinaires (Inesi et al. 1980; Champeil et al. 1983; Inesi 1987), il existe une controverse concernant le mécanisme détaillé de fixation de Ca^{2+} à l'origine de cette coopérativité. Pour certains, la fixation d'un premier Ca^{2+} induit un changement de conformation nécessaire à la fixation d'un deuxième Ca^{2+} (Inesi et al. 1980). Une autre interprétation est aussi possible : si les deux sites de fixation sont présents sur E1 mais pas sur E2, et si l'équilibre initial entre ces deux conformations est favorable à E2, la fixation (rare) d'un premier Ca^{2+} sur l'enzyme (en E1) va déplacer l'équilibre $\text{E2} \leftrightarrow \text{E1}$ vers E1, permettant la fixation du deuxième Ca^{2+} avec son affinité normale ; et donc l'affinité apparente avec laquelle le deuxième Ca^{2+} se fixera sera meilleure que l'affinité apparente avec laquelle le premier s'est fixé, ce qui assure la coopérativité positive (de Meis and Vianna 1979; Tanford et al. 1985; Wakabayashi and Shigekawa 1990). Par ailleurs, Forge et collaborateurs ont inclus explicitement dans le schéma de fixation du Ca^{2+} les formes protonées et déprotonées de l'ATPase (Forge et al. 1993a; b). Le degré exact de coopérativité dépend en effet du pH (Forge et al. 1993a), et de précédents résultats avaient suggéré que l'équilibre $\text{E2} \leftrightarrow \text{E1}$ était fortement dépendant du pH, la forme E2 étant favorisée à pH acide (Pick and Karlsh 1982). Comme nous le reverrons plus loin, ces résultats ne sont pas sans rapport avec l'existence d'un contre-transport de protons, en échange des ions Ca^{2+} . Mentionnons pour terminer que le Mg^{2+} a également un effet modulateur sur la fixation de Ca^{2+} (Champeil et al. 1983; Champeil et al. 1997). Cet effet a parfois été attribué à la présence de sites régulateurs sur l'ATPase (Henderson et al. 1994a; Henderson et al. 1994b).

Les *cinétiques* de fixation et de dissociation du Ca^{2+} ont tout d'abord été étudiées à basse température, en comparant des expériences de fixation ou de dissociation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et des mesures de changements de fluorescence intrinsèque des Trp. Les mesures de dissociation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ révélaient notamment que l'un des deux Ca^{2+} restait échangeable en toutes

circonstances, mais bloquait la dissociation de l'autre (Dupont 1982). Dans le même temps, Ikemoto et collaborateurs tentaient de discriminer entre les deux ions Ca^{2+} sur la base d'expériences de «quench flow», elles aussi réalisées à basse température. Il a fallu attendre la mise au point d'appareillages de filtration rapide (voir Matériel et Méthodes) pour que de telles expériences puissent être réalisées à température ambiante (Dupont 1984). Les mesures ont confirmé la cinétique biphasique d'échange $^{45}\text{Ca}^{2+}/^{40}\text{Ca}^{2+}$ (Inesi 1987; Orlowski and Champeil 1991a) : tout se passe comme si un des deux ions (le Ca^{2+} dit « profond ») ne pouvait pas se dissocier de l'ATPase tant que l'autre (le Ca^{2+} « superficiel ») n'était pas décroché. Avec une technique de quench flow, Petithory et Jencks aussi montrent que la dissociation des ions Ca^{2+} dépend de la concentration en Ca^{2+} dans le milieu. Leur approche consiste à étudier la cinétique à laquelle l'ATPase perd sa capacité à se phosphoryler (Rauch et al. 1978; Sumida et al. 1978) ou à internaliser du $^{45}\text{Ca}^{2+}$, en fonction de la concentration de Ca^{2+} non radioactif présent dans le milieu. Cette approche leur a permis de confirmer que la fixation des deux ions Ca^{2+} était indispensable à la formation de l'enzyme E1PCa_2 . Les deux sites ont été décrits comme non équivalents, et de nouveau supposés en file indienne (Petithory and Jencks 1988). Un mécanisme identique avait déjà été décrit pour comprendre la dissociation de potassium (ou de Rb^+) de l'ATPase Na^+, K^+ phosphorylée (Glynn et al. 1985).

Ces résultats ont été confirmés ultérieurement (Orlowski and Champeil 1991a; Champeil et al. 1997). De plus, ces deux derniers travaux attiraient l'attention sur le fait que la dissociation des deux ions Ca^{2+} semble le plus souvent parfaitement monophasique. Comment peut-on réconcilier une dissociation apparemment monophasique et le caractère séquentiel de la dissociation de deux ions? L'interprétation a été proposée par Forbush dans ses travaux sur l'ATPase Na^+, K^+ (Forbush 1987b; a): dans un schéma de dissociation séquentielle, il suffit que la dissociation du Ca^{2+} profond se fasse avec une constante de dissociation apparente deux fois plus faible que celle du Ca^{2+} superficiel pour que la dissociation globale des deux ions soit monophasique. Et pour que cela soit le cas, il suffit, d'un point de vue mécanistique, d'admettre que les deux ions résident dans une poche de fixation à deux places équivalentes, dont la sortie est bloquée par une porte oscillante qui ne s'ouvre que brièvement. Ainsi, après que le Ca^{2+} superficiel se soit dissocié, avec une constante de vitesse qui reflète la probabilité d'ouverture de la porte, le Ca^{2+} résiduel se relocalise aléatoirement sur l'un ou l'autre des deux sites, et il se dissociera donc (lors de la prochaine ouverture de la porte) avec une cinétique apparente deux fois plus lente. Toutefois, à l'heure actuelle, on ne peut pas exclure que la dissociation du premier Ca^{2+} entraîne un changement de conformation permettant la dissociation du deuxième Ca^{2+} avec une vitesse justement réduite de moitié.

Tout comme le Ca^{2+} , l'ATPase- Ca^{2+} peut également fixer le strontium, avec une affinité moindre que le calcium mais avec la même stoechiométrie (Berman and King 1990). Le Sr^{2+} induit lui aussi des variations de fluorescence de l'enzyme, native ou marquée par du FITC (un fluorophore extrinsèque fixé de façon covalente dans le domaine N), et il est apparu que, à pH neutre, la fluorescence intrinsèque des Trp ne commençait à varier qu'à des concentrations de Sr^{2+} légèrement plus élevées que les concentrations faisant varier la fluorescence du FITC. Ceci implique qu'une proportion significative de l'ATPase ne fixe qu'un seul ligand, plutôt que zéro ou deux comme ce serait le cas dans l'hypothèse d'une forte coopérativité: les variations de fluorescence du FITC pourraient ainsi refléter des changements de conformations précoces, par exemple liés à la fixation du premier calcium (ou au déplacement d'un équilibre E2-E1 préexistant), alors que la fluorescence des Trp révélerait principalement la fixation du deuxième strontium (voire Ca^{2+}) sur l'ATPase (Orlowski and Champeil 1993).

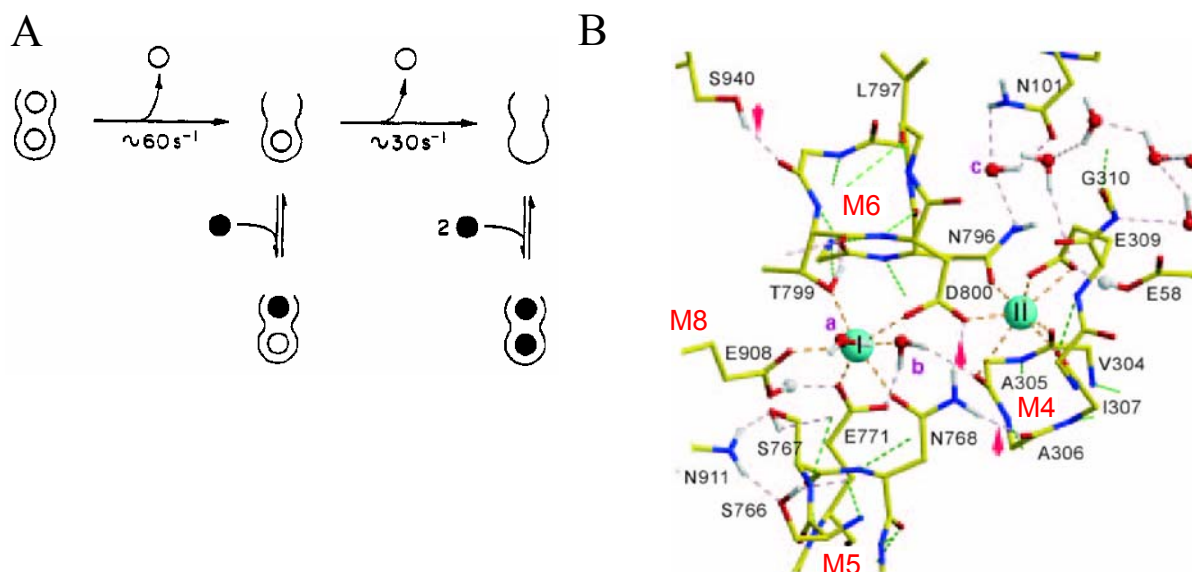


Figure 11. Sites de fixation des ions Ca^{2+} , d'après (Petithory and Jencks 1988; Obara et al. 2005)

La structure cristallographique a clairement révélé les deux sites de fixation du Ca^{2+} (cf Figure 11). Le site I est localisé entre les hélices M5, M6 et M8. En accord avec des études de mutagenèse dirigée, il a été retrouvé que ce site de fixation était constitué des oxygènes des chaînes latérales des résidus Asn768 et Glu771 sur M5, Thr799 et Asp800 sur M6, et Glu908 sur M8. Le site II est principalement situé « sur » M4: le Ca^{2+} y est lié aux oxygènes des groupements carbonyles de Val304, Ala305, et Ile 307 (sur M4), et aux oxygènes des chaînes latérales des résidus Glu309 ; participent également à la formation du site les résidus Asn796 et Asp800 sur M6. Remarquons que la formation du site II est rendue possible par le désenroulement local du segment transmembranaire M4. Ces sites de fixation du Ca^{2+} sont stabilisés par un réseau de liaisons hydrogènes faisant intervenir les groupements carbonyles des résidus voisins ainsi que des molécules d'eau. Notons que la déprotonation de certains résidus est évidemment un pré-requis à la fixation de calcium (cf ci-dessus l'effet du pH).

Notons aussi que l'unique site de fixation du Ca^{2+} présent dans les deux autres pompes à Ca^{2+} déjà mentionnées dans la famille des ATPases de type P, SPCA et PMCA, correspond au site II.

Notons enfin que l'on ne distingue pas vraiment dans cette structure de voie d'accès évidente depuis le milieu cytosolique jusqu'aux sites. Par ailleurs, si les sites sont proches (Asp800 fournissant même l'un de ses oxygènes à chacun des deux ions), ils sont passablement dissymétriques, contrairement au schéma suggéré par la Figure 11A ...

5. Fixation d'ATP, phosphorylation et occlusion du calcium

Des mesures de fluorescence intrinsèque ont permis de mesurer l'affinité de SERCA pour l'ATP dans différentes conditions (Dupont et al. 1982; Lacapère et al. 1990), mais toujours en absence de Ca^{2+} car la présence simultanée de Ca^{2+} et d'ATP met en route le cycle catalytique. Il est aussi possible d'étudier la fixation d'ATP radioactif dans les mêmes conditions. Le magnésium est un cofacteur essentiel de cette fixation, puisque le Mg^{2+} .ATP est le substrat physiologique de l'ATPase (Meissner 1973). Toutefois, il a été suggéré que le

Mg²⁺ et l'ATP se fixent de manière indépendante et aléatoire (Reinstein and Jencks 1993). En absence de Ca²⁺ et de Mg²⁺, la fixation d'ATP est indépendante du pH et se fait avec une affinité de 20 μ M. En présence de 2 mM de Mg²⁺, l'affinité est d'autant meilleure que le pH est élevé (Lacapère et al. 1990). Au contraire, l'ADP a une affinité indépendante du Mg²⁺, et comme pour l'ATP, l'affinité est meilleure quand le pH augmente (40 μ M à pH 6, 6 μ M à pH 8). David McIntosh arrive aux mêmes ordres de grandeur en se basant sur une technique de marquage photochimique, en déplaçant un analogue de l'ATP, l'azido-TNP-ATP, par des concentrations croissantes de nucléotides (Ross and McIntosh 1987a; McIntosh et al. 1996; McIntosh et al. 1999).

Une multitude de cofacteurs peuvent se substituer au Mg²⁺ lors de la phosphorylation par l'ATP : le manganèse (Yamada and Ikemoto 1980; Sumida et al. 1986; Ogurusu et al. 1991), le chrome (Serpensu et al. 1982), le cobalt (Yamada and Ikemoto 1980; Sumida et al. 1986), le zinc, le fer, le nickel (Sumida et al. 1986), et les lanthanides (Fujimori and Jencks 1990). Le Ca²⁺ lui-même peut remplacer le Mg²⁺ au site catalytique (Yamada and Ikemoto 1980; Shigekawa et al. 1983): la vitesse maximale de phosphorylation devient neuf fois plus faible qu'avec le Mg²⁺.ATP (Shigekawa et al. 1983), et l'étape de phosphorylation peut devenir plus lente que la fixation d'ATP (Lacapère et al. 1990). En présence de Mg²⁺, la fixation d'ATP est normalement suivie très rapidement de la phosphorylation : la fixation d'ATP et la phosphorylation finale ont des cinétiques très similaires (Lacapère and Guillain 1993). La fixation elle-même est relativement lente lorsqu'on se place à des faibles concentrations, micromolaires. A plus forte concentration d'ATP, un changement conformationnel faisant suite à la fixation du nucléotide est réputé être limitant pour la phosphorylation (Petithory and Jencks 1986).

Notons au passage que l'ATP est connu pour moduler les autres étapes du cycle catalytique. En particulier, la transition E2→E1 est accélérée en présence d'ATP : Scofano et collaborateurs (da Gloria et al. 1976; Souza and de Meis 1976; Scofano et al. 1979) ont les premiers montré que la cinétique de phosphorylation est plus rapide quand l'enzyme a été préalablement incubée en présence de Ca²⁺ que lorsqu'on ajoute ATP et Ca²⁺ simultanément à une ATPase préincubée en absence de Ca²⁺, et d'autre part que cette accélération était observée pour des concentration d'ATP supérieures à celles requises pour obtenir un niveau de dérivé phosphorylé maximal. L'activation en question serait due à l'accélération de la transition E2→E1 par fixation d'ATP sur E2. Cette accélération a aussi été décrite pour l'ATPase Na⁺,K⁺, et d'un point de vue fonctionnel elle est alors particulièrement importante : dans le cas de l'ATPase Na⁺,K⁺, la transition E2→E1 reste l'étape limitante du cycle même en présence d'ATP (Lupfert et al. 2001; Humphrey et al. 2002)(ce qui, le plus souvent, n'est pas le cas pour SERCA). D'autre travaux ont permis de mettre en évidence cet effet activateur de l'ATP sur la transition E2→E1 (Wakabayashi and Shigekawa 1990; Mintz et al. 1995). A des concentrations millimolaires, l'ATP active aussi les vitesses de transition de Ca₂E1P à E2P et de E2P à E2 (Champeil and Guillain 1986), et, là, cette activation retentit sur la vitesse d'hydrolyse globale de l'ATP par l'ATPase Ca²⁺.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la phosphorylation par l'ATP, après fixation, n'est possible que lorsque les deux ions Ca²⁺ sont fixés sur leurs sites de transport (Petithory and Jencks 1988). Le phosphate γ de l'ATP est alors transféré sur l'Asp351 catalytique: on obtient un composé à haute énergie, un phosphoenzyme, stable en milieu acide (Makinose 1972). Le transfert du γ -phosphate conduit aussi à l'occlusion du Ca²⁺ au sein de ses sites de fixation (Dupont 1980; Takisawa and Makinose 1983). Il est par ailleurs possible de stabiliser cet état occlus en présence de Cr.ATP (Serpensu et al. 1982; Vilsen and Andersen 1986), bien que dans ces conditions, les Ca²⁺ soient occlus sans qu'il y ait transfert du γ -phosphate. Grâce à la mutagenèse dirigée, il a été possible de déterminer quels étaient les résidus impliqués dans le phénomène d'occlusion (Vilsen and Andersen 1992; Andersen and

Vilsen 1994). Parmi ces résidus, l'Asp309 joue un rôle prépondérant (Vilsen and Andersen 1998; Inesi et al. 2004).

La publication des structures de SERCA en présence d'un analogue de nucléotide (forme « E1.AMPPCP », cf. 1T5S et 1VFP, (Sørensen et al. 2004b; Toyoshima and Mizutani 2004)) et en présence d'un composé fluoré supposé mimer l'état de transition adopté par l'enzyme au moment de sa phosphorylation par l'ATP (forme « E1.ADP.AIFx », cf. 1T5T et 1WPE, (Sørensen et al. 2004b; Toyoshima et al. 2004)) (voir Figure 9 ci-dessus et Figure 12 ci-dessous), a permis de répondre à un certain nombre de questions importantes concernant la séquence d'événements aboutissant à la phosphorylation. Les résultats sont cohérents avec ce que l'on pouvait déjà deviner à partir des structures de certains membres de la superfamille des HAD (Lahiri et al. 2003). Toutefois, par certains de leurs aspects, ces structures sont paradoxales pour des raisons que l'on discutera plus loin.

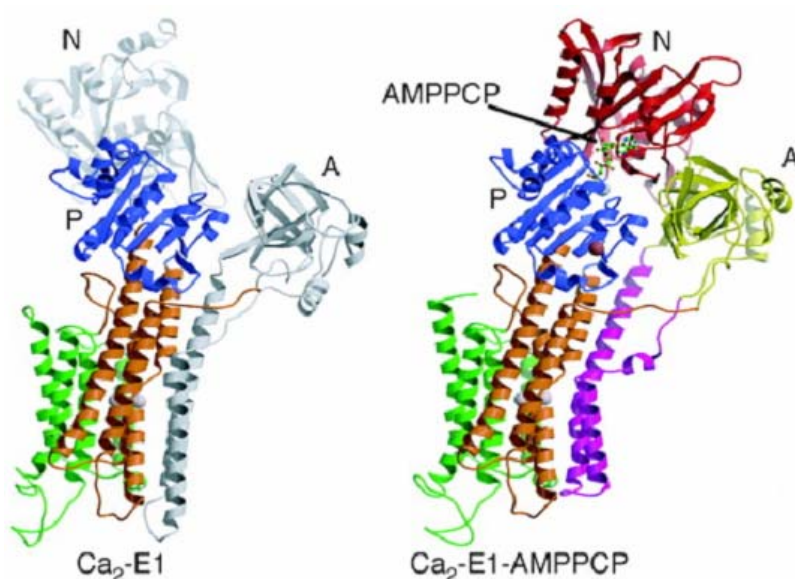


Figure 12, A&B. Comparaison des formes Ca₂.E1 (1SU4) et Ca₂.E1.AMPPCP (1T5S/1VFP) d'après (Sørensen et al. 2004b)

La fixation de nucléotide sur E1Ca₂ et la formation de l'état de transition induiraient de larges changements conformationnels (Figure 12 A&B). On passerait d'une structure protéique ouverte, dans laquelle les domaines N et A sont présumés être positionnés de façon relativement flexible par rapport au domaine P, à une structure polypeptidique compacte, plus rigide, quasiment indistinguable pour l'ATPase en présence du seul nucléotide et pour l'analogue E1.ADP.AIFx de l'état de transition (d'où la présence sur la Figure 12 de la seule structure en AMPPCP). Ces deux dernières structures sont en effet décrites comme ayant des architectures extrêmement similaires (on reviendra là-dessus dans le reste de cette thèse): seuls les facteurs B (paramètres cristallographiques décrivant la dynamique de chacun des acides aminés) sont légèrement différents.

Dans la partie cytosolique, les domaines N, P et A sont regroupés de manière à ce que le nucléotide triphosphate puisse présenter son phosphate gamma à l'Asp351 du domaine P. Ce regroupement des trois domaines cytosoliques permet la formation d'une poche de fixation pour le nucléotide à l'interface des domaines N et P, poche bordée de résidus très conservés et pour la plupart reconnus critiques lors d'études de mutagenèse dirigée (Maruyama et al. 1989; Clarke et al. 1990; McIntosh et al. 1999). Les résidus Arg678 (domaine P), Arg489 et Arg560 (domaine N) stabilisent respectivement l'oxygène 3 du ribose, le phosphate α et le

phosphate β . Le phosphate γ de l'AMPPCP interagit avec un ion métallique, ici modélisé comme étant un ion Mg^{2+} , également coordonné par la fonction carbonyle de Thr353 et les chaînes latérales de Asp703 et Asp351 (résidus situés sur le domaine P). De plus ce phosphate γ , situé à 3,4 Å de l'Asp351, est stabilisé par des liaisons hydrogènes formées par les chaînes latérales de Thr353 et Thr625 et par la fonction amide du squelette peptidique de Gly626 (Figure 13, A&B, ci-dessous ; Gly 626 n'est pas représenté sur cette Figure pour des raisons de clarté).

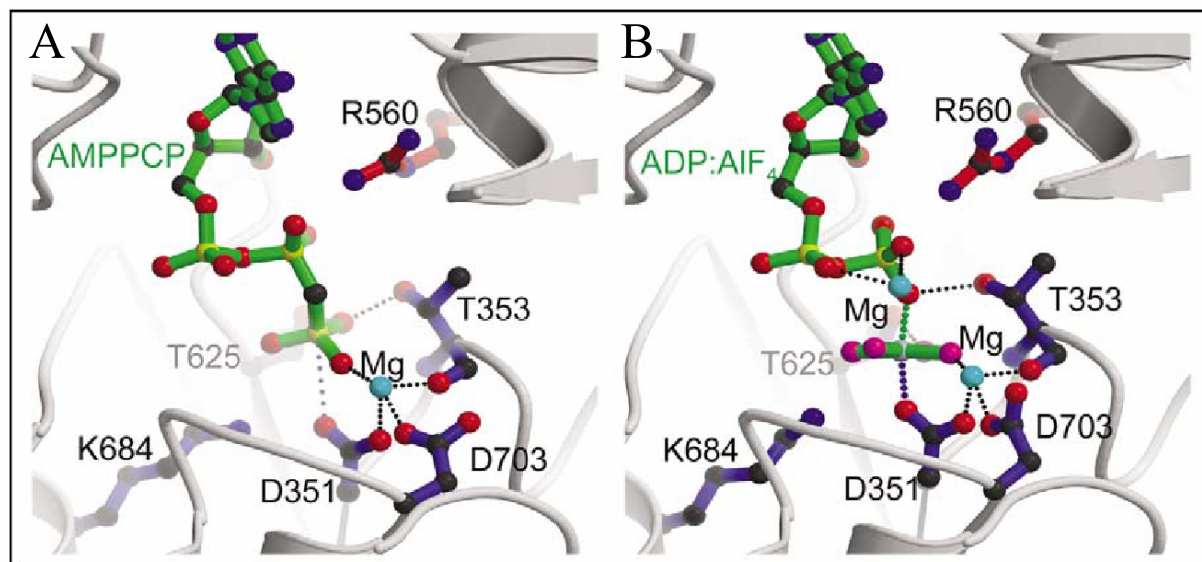


Figure 13, A&B. Comparaison des sites de fixation nucléotidiques pour les formes E1.AMPPCP (1T5S/1VFP) et E1.ADP.AIFx (1T5T / 1WPE), d'après (Møller et al. 2005)

Du fait de son inclinaison de 90° vers le domaine P, le domaine N entre alors en contact avec le domaine A (voir figure 12B). Dans le même temps, le domaine A réalise un mouvement de rotation autour d'un axe perpendiculaire à la membrane, qui a pour effet d'induire la réorganisation des domaines transmembranaires qui lui sont liés. Ainsi, l'hélice M2 remonte verticalement d'un tour d'hélice vers le haut, ce qui conduit l'hélice M1 à se «plier» sur la surface membranaire. Ces mouvements induisent des modifications significatives dans l'accessibilité des Ca^{2+} à leurs sites. En effet, la chaîne latérale de l'acide aminé Glu309 réputé crucial pour le mécanisme d'occlusion se trouve désormais doublement immobilisée, d'une part par contact de Van der Waals avec la Leu65 (sur M1) qui lui fait face dans E1.AMPPCP ou E1.ADP.AIFx (mais pas dans E1Ca₂), d'autre part grâce à la formation de liaisons hydrogènes avec N796 (sur M6) (et non plus avec Glu58 (sur M1), comme c'était le cas dans la forme E1Ca₂) (voir Figure 14A (Toyoshima and Mizutani 2004)). De plus le mouvement des résidus Asp51, Asp55, Gln56, Asp58, Asp59, Trp107, Asp109 et Trp932 ferme l'accès aux sites transmembranaires de fixation, à la manière d'un « bouchon » hydrophobe, voir Figure 14B (Møller et al. 2005).

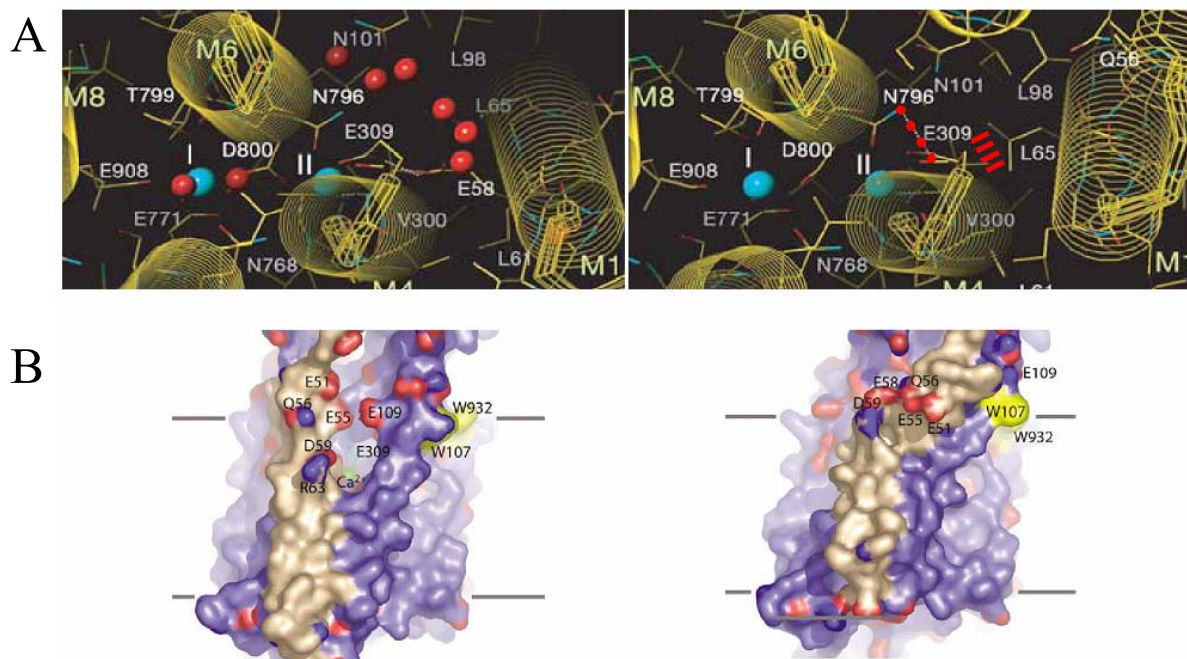


Figure 14, A&B. Mécanismes menant à l'occlusion du Ca^{2+} (à gauche, E1Ca_2 ; à droite, $\text{E1Ca}_2 \cdot \text{AMPPCP}$) d'après (Toyoshima and Mizutani 2004) (A) et (Møller et al. 2005) (B)

Comme nous l'avons dit précédemment, les deux structures E1.AMPPCP et E1.ADP.AIFx sont pratiquement identiques. Ce fait nous a semblé passablement paradoxal, car si l'occlusion des ions Ca^{2+} est avérée dans la forme ADP/fluoroaluminate mimant l'état de transition, les données bibliographiques disent le contraire en présence d'un simple nucléotide, avant phosphorylation. Nous avons consacré une large part de ce travail de thèse à l'élucidation de ce paradoxe: les travaux correspondants sont relatés au chapitre V, première partie.

6. Transition $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ et relargage du calcium du côté luminal

La transition $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ est une étape relativement lente (par rapport aux autres étapes du cycle) après phosphorylation en présence de Mg^{2+} (Suzuki and Kanazawa 1995; Barth 1999), et l'est encore plus après phosphorylation en présence de lanthane (Fujimori and Jencks 1990) ou encore en présence de Ca^{2+} seul, sans Mg^{2+} (Shigekawa et al. 1983). Dans les études qui ont abouti à cette conclusion, l'apparition de la forme E2P est traditionnellement révélée par son incapacité à reformer de l'ATP en présence d'ADP (Shigekawa and Dougherty 1978b; a; Shigekawa et al. 1978). Cette transition $\text{Ca}_2\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ accomplie, les sites de fixation de Ca^{2+} sont réputés s'orienter du côté luminal, et leur affinité diminue. De fait, les ions Ca^{2+} se dissocient alors de leurs sites vers la lumière du réticulum endoplasmique (Ikemoto et al. 1981; Andersen et al. 1985; Champeil et al. 1986).

De même que la façon avec laquelle les ions Ca^{2+} se fixent sur leurs sites à haute affinité, côté cytosolique, est controversée, l'ordre de dissociation des ions Ca^{2+} du côté luminal n'est pas complètement clair. Certaines expériences privilégient l'idée d'une dissociation luminale séquentielle (Inesi 1987; Forge et al. 1995). A l'inverse, dans des conditions expérimentales différentes, d'autres mesures suggèrent des vitesses de dissociation luminale similaires pour les deux ions (Hanel and Jencks 1991; Orłowski and Champeil 1991b).

Le débat est également ouvert concernant les sites d'où le Ca^{2+} se dissocie vers la lumière du réticulum: deux hypothèses sont en présence. La vision la plus classique (schématisée sur le cycle de la Figure 8 ci-dessus) consiste à dire que lors de la transition $\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$, les sites de haute affinité changent d'orientation et perdent leur affinité pour le Ca^{2+} . Mais il existe quelques publications suggérant l'existence de sites à basse affinité additionnels, distincts: les Ca^{2+} passeraient des uns aux autres pendant la transition $\text{E1P} \rightarrow \text{E2P}$ (Jencks et al. 1993; Meszaros and Bak 1993; Myung and Jencks 1994; Lee and East 2001; Vieyra et al. 2004).

De nombreuses études ont déjà suggéré que l'ATPase subissait de grands changements conformationnels entre $\text{Ca}_2\text{E1P}$ et E2P , avec peut-être un site de phosphorylation plus hydrophobe en E2P (de Meis et al. 1980; Dupont and Pougeois 1983; Pickart and Jencks 1984; Barth 1999). Des données structurales permettront vraisemblablement dans l'avenir de comprendre le couplage entre changement de conformation et relargage de Ca^{2+} du côté luminal. Une structure cristalline correspondant à « l'état fondamental » du dérivé phosphorylé E2P n'a cependant pas encore été obtenue. On en est réduit à spéculer, sur la base de cristaux correspondant vraisemblablement à l'état de transition adopté par l'ATPase lors de sa déphosphorylation. On en reparlera plus loin.

7. Déphosphorylation

Après dissociation des ions Ca^{2+} dans le lumen, il y a formation d'une espèce E2P incapable de reformer de l'ATP à partir d'ADP. Mais cette espèce peut réagir avec une molécule d'eau pour donner une forme déphosphorylée E2 , ce qui achèvera la réaction d'hydrolyse de l'ATP. Il est possible de former cette espèce E2P sans passer par la phosphorylation par l'ATP, mais en profitant de la réversibilité du cycle catalytique : à partir de E2 , la réaction $\text{E2} \rightarrow \text{E2P}$ est possible, en présence de phosphate inorganique (Kanazawa and Boyer 1973; Masuda and de Meis 1973). Cette réaction est inhibée par le Ca^{2+} et par le strontium, car ces ions déplacent l'équilibre enzymatique vers des conformations de type E1 , non réactives avec le P_i (Sumida et al. 1986). Comme pour la phosphorylation par l'ATP, le Mg^{2+} est le co-facteur physiologique pour la phosphorylation par le P_i , mais comme lors de la phosphorylation par l'ATP, le Mg^{2+} peut être remplacé par une variété d'autres ions métalliques pour la phosphorylation par le P_i (Mintz et al. 1990).

En absence de solvant organique, la réaction est très dépendante du pH: à pH 6, le niveau de phosphorylation est optimal et l'affinité apparente pour le P_i est de l'ordre du mM (Masuda and de Meis 1973); en revanche, la phosphorylation est moins favorable à pH alcalin (de Meis et al. 1980). De nombreux facteurs influencent cette réaction, comme la température (une température élevée favorise la formation de E2P), la présence de KCl (qui défavorise E2P , en accélérant la déphosphorylation), la présence de Mg^{2+} déjà évoquée (Lacapère et al. 1981) et les solvants organiques, au premier rang desquels le diméthyl-sulfoxyde (DMSO) (de Meis et al. 1980; Champeil et al. 1985). L'interprétation de l'augmentation par le DMSO de l'affinité apparente pour le P_i ne fait pas l'unanimité: certaines données expérimentales favorisent l'hypothèse d'une augmentation en présence de DMSO de l'affinité vraie de fixation du P_i sur l'ATPase (la partition du P_i dans le site actif devenant plus favorable lorsque sa solubilité dans le milieu aqueux diminue en présence de DMSO (de Meis et al. 1980; de Meis et al. 1982; Seekoe et al. 2001)); d'autres privilégient une augmentation apparente de l'affinité pour la phosphorylation, par stabilisation de l'état phosphorylé (Mintz et al. 1993).

En mesurant la dépendance vis à vis du Mg^{2+} et du P_i de la formation du dérivé phosphorylé, Punzengruber et collaborateurs étaient arrivés à la conclusion que la fixation du Mg^{2+} et du P_i sont indépendantes (Punzengruber et al. 1978), une conclusion cohérente avec une étude ultérieure des effets de la fixation du Mg^{2+} et du P_i sur la fluorescence de l'enzyme

(Lacapère et al. 1981). Toutefois, ces études peuvent être réexaminées à la lumière de l'effet des solvants organiques sur les événements induits par le Mg^{2+} . En présence de DMSO, le substrat semble bien être le complexe $Mg.Pi$, et cela reste peut-être vrai en son absence (Champeil et al. 1985).

Une fois encore, les résultats structuraux obtenus par diffraction des rayons X ont été d'une grande aide dans la compréhension des mécanismes aboutissant à la déphosphorylation. Pratiquement dans le même temps, les groupes de Chikashi Toyoshima et de Poul Nissen ont publié les structures de complexes présumés mimer deux étapes du processus de déphosphorylation: le complexe de l'ATPase avec le fluoroaluminate (mais ici en absence de Ca^{2+}), $E2.AIF_4$, supposé mimer l'état de transition adopté par l'enzyme au moment de sa déphosphorylation (1XP5, (Olesen et al. 2004)), et le complexe de l'ATPase avec le fluorure de magnésium (toujours en absence de Ca^{2+}), $E2.MgF_4$, supposé mimer l'état final adopté par l'enzyme en présence de Pi lorsque la déphosphorylation a réellement eu lieu (1WPG, (Toyoshima et al. 2004)) (cf structures dans Figure 3). Ces deux structures révèlent des architectures polypeptidiques très semblables, et suggèrent les mêmes interprétations concernant les mouvements du domaine A et les résidus mis en jeu dans la déphosphorylation, mais présentent des vues un peu divergentes concernant le couplage entre ces mouvements cytosoliques et leurs conséquences au niveau transmembranaire.

Le changement le plus spectaculaire entre la forme $E1.ADP.AIF_x$ et ces formes $E2.MeF_4$ concerne le mouvement du domaine A : le domaine A a subi une rotation d'environ 110° parallèlement à la membrane. A la suite de cette rotation, le domaine A se retrouve toujours en contact avec les domaines N et P, mais il présente désormais sa séquence hautement conservée (la séquence TGES) juste en regard de l'aspartate catalytique. Il était pressenti depuis un certain temps que cette séquence était importante pour le processus de déphosphorylation : le fait que la séquence TGES se rapproche du domaine P avait été subodoré sur la base d'expérience de coupures en présence de Fe^{2+} (Patchornik et al. 2000; Patchornik et al. 2002), et son rôle particulier avait été caractérisé plus spécifiquement grâce à la mutagenèse dirigée (Clausen et al. 2004). Dans ces années là, j'avais moi-même participé à un travail de protéolyse ménagée qui sera décrit plus loin, et qui suggérait explicitement que le positionnement fin du domaine A de l'ATPase était à la base de la deuxième partie du cycle de l'ATPase, l'activité phosphatase exercée aux dépens du dérivé phosphorylé E2P (Lenoir et al. 2004). De manière définitive, la publication d'Olesen et al. décrit le rôle des résidus Glu183 et Thr181 dans le positionnement de la molécule d'eau attaquant la liaison acylphosphate. De son côté, la structure de Toyoshima suggère plutôt le rôle de Gly182 plutôt que Thr181. Cette petite divergence traduit sans doute le fait que le positionnement exact du domaine A est indispensable à la déphosphorylation (Olesen et al. 2004); elle pourrait aussi illustrer en quoi un analogue fluoré donné n'est pas forcément complètement représentatif des états que l'on espère isoler.

On a vu ci-dessus qu'il manquait encore une structure cristalline correspondant à l'état fondamental du dérivé phosphorylé E2P. Si, cependant, on fait l'hypothèse (raisonnable ?) que les formes E1P et E2P ne sont pas trop différentes des états de transition mimés par les formes $E1.ADP.AIF_x$ et $E2.AIF_4$, la comparaison de ces deux structures expérimentales (Figures 9 et 15) permet de discuter plus avant la transition $E1P \rightarrow E2P$. Comme on l'a dit, le changement le plus spectaculaire est la rotation du domaine A. La structure de la forme $E1.ADP.AIF_x$ est sans doute très contrainte, en particulier à cause de la « tension » entre le domaine A et le segment transmembranaire M3 (ce lien est allongé de 3 Å par rapport à E1 (Toyoshima et al. 2004)). Dans la forme $E1.ADP.AIF_x$, cette structure reste stable grâce à la présence de l'ADP qui permet aux domaines N et P d'interagir l'un avec l'autre. Toyoshima propose que ce soit le départ de l'ADP qui induise la relaxation de l'ATPase vers une

conformation E2P-like, en permettant aux sites N et P de se désolidariser grâce à une rotation du domaine N de 50° (à ce titre, le nucléotide a été qualifié de « crosslinker clivable » par (Toyoshima and Mizutani 2004)). De plus, la structure finale E2P-like serait stabilisée par des interactions électrostatiques entre le domaine A et plusieurs résidus chargés des domaines N et P: ces interactions font notamment entrer en jeu les résidus 198 à 202 du domaine A, ce qui explique la perte totale d'activité du mutant Val200 décrit dans (Kato et al. 2003). Au cours de la transition « E1P→E2P », la boucle du domaine A portant la séquence TGES, en se rapprochant du domaine de phosphorylation, viendrait quasiment prendre la place de l'ADP (voir Figure 15 ci-dessous), et empêcherait donc celui-ci de revenir au contact du résidu phosphorylé, ce qui interdirait alors toute synthèse d'ATP: ceci expliquerait pourquoi le résidu E2P n'est plus « sensible à l'ADP », alors que ce même E2P est parfaitement capable de fixer de l'ADP (McIntosh et al. 1991).

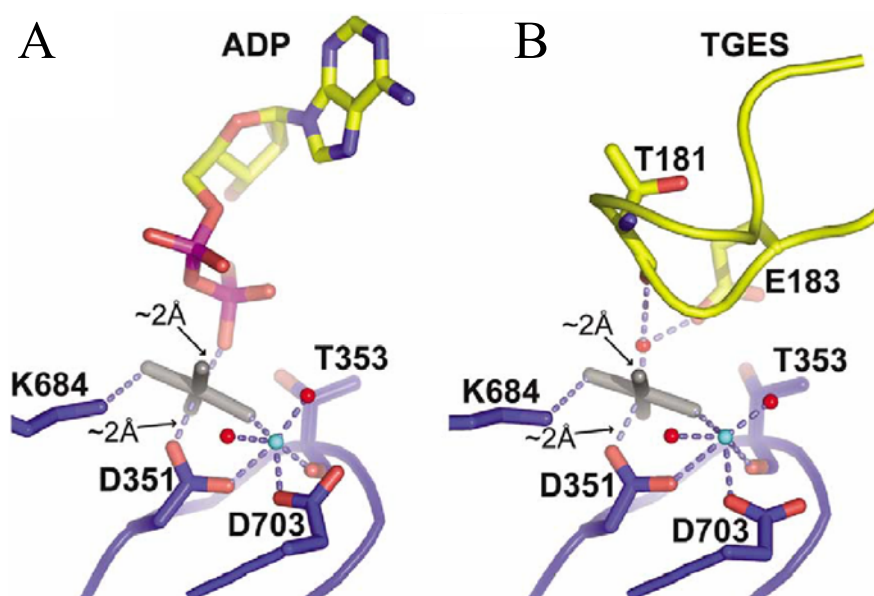


Figure 15. Comparaison des analogues présumés des états de transition formés lors de la phosphorylation et de la déphosphorylation, d'après (Møller et al. 2005) : à gauche, E1.ADP.AIF_x, à droite, E2.AIF₄.

Comme précédemment décrit pour la transition entre E1 et E1.AMPPCP ou E1.ADP.AIF_x, les mouvements des domaines cytosoliques au cours de la transition de E1P à une forme « E2P-like » entraînent des réorganisations dans les segments transmembranaires. M3 et M4 sont déplacées d'un tour d'hélice vers le bas alors que M5 se plie vers M1, ce qui entraîne la rotation du domaine P de 30°. La résultante de ces mouvements est la déstabilisation totale des sites de fixation et leur perte d'affinité pour le Ca²⁺, requise pour permettre tout relargage vers la lumière du réticulum sarcoplasmique. Encore une fois, le mouvement du domaine A joue un rôle d'effecteur critique (« Actuator ») dans une étape du cycle catalytique. C'est ce rôle crucial qui a été mis en évidence lors des différentes études de l'effet de la déstabilisation du lien entre domaine A et segments transmembranaires, que ce soit par protéolyse ménagée à la protéinase K (Lenoir et al. 2004; Yamasaki et al. 2004) ou par mutagenèse dirigée (Daiho et al. 2003; Kato et al. 2003; Clausen et al. 2004).

Un point de divergence, néanmoins, entre les interprétations de ces structures faites à Aarhus et à Tokyo, concerne le moment de la fermeture de l'accès luminal aux sites de fixation des ions Ca²⁺. Toyoshima et collaborateurs considèrent qu'il y a fermeture de la porte luminale au moment du départ du phosphate, alors que Olesen et collaborateurs jugent que la

porte est déjà fermée dans l'état de transition E2.AIF₄: selon ces derniers, la fermeture aurait lieu au moment de la déphosphorylation, et serait en fait nécessaire à un positionnement stable des groupes engagés dans l'attaque de la liaison acylphosphate. De fait, il a été déjà suggéré que les complexes stabilisés en présence d'AIF₄ et de MgF₄ ont des sites luminaux seulement faiblement accessibles, au contraire des complexes stabilisés en présence de fluorure de béryllium, vraisemblablement plus représentatifs de la forme E2P du point de vue de l'accessibilité luminale des ions Ca²⁺ (Danko et al. 2004); ceci est plutôt cohérent avec l'interprétation d'Olesen et al. On verra que nous avons essayé de contribuer à éclaircir ce point. Nous nous sommes également demandés si la présence de thapsigargine (TG) dans ces structures affectait leur signification (cf chapitre V, deuxième partie).

Mentionnons pour terminer qu'un site de fixation pour le K⁺ a été identifié pour les structures E1.ADP.AIF₄ (Sørensen et al. 2004a) et E2.AIF₄ (Olesen et al. 2004). Ce site de fixation a été initialement mis en évidence à partir d'un cristal E1.ADP.AIF₄ dans lequel le K⁺ a été remplacé par du Rb⁺: profitant des propriétés de diffusion anormale du Rb⁺, Sørensen et collaborateurs ont pu mieux révéler ce site (Sørensen et al. 2004a). Il a ensuite été mis en évidence également dans la structure E2.AIF₄. Dans cette dernière structure, la fixation du K⁺ sur ce site permettrait un pontage entre la partie inférieure du domaine P (P4 et P5) et la boucle reliant le segment transmembranaire M3 au domaine A, ce qui stabiliserait le domaine A face au dérivé phosphorylé Asp351. Or, nous avons vu qu'un positionnement adéquat du domaine A est critique dans l'étape de déphosphorylation: la description du site de fixation du K⁺ et les conséquences structurales de cette fixation expliqueraient donc le rôle du K⁺ dans l'étape de déphosphorylation de la conformation E2P (Figure 16, ruban bleu). Après déphosphorylation (Figure 16, ruban gris), le motif TGES du domaine A s'éloigne du site de phosphorylation, et le site de fixation du K⁺ disparaît.

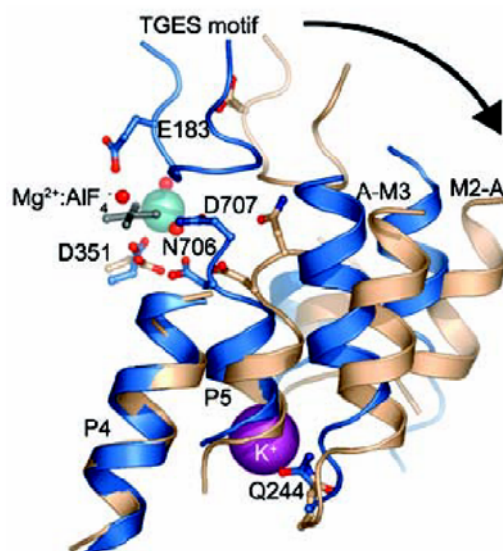


Figure 16. Site de fixation du K⁺ sur E2.AIF₄ (ruban bleu), et structure de la forme E2(TG) (ruban gris) d'après (Olesen et al. 2004)

8. Transition E2-E1 et contre-transport de protons

La structure de l'ATPase en absence de Ca^{2+} (mais en présence d'un inhibiteur de l'ATPase, la thapsigargine, TG) a été publiée en 2002, peu après la structure $\text{E1}(\text{Ca}^{2+})_2$. Elle a révélé les grandes réorganisations conformationnelles subies lors de la transition E1-E2 (voir Figure 9 et (Toyoshima and Nomura 2002)). Puisque dans cette introduction nous avons pris le parti de décrire les différentes structures de l'ATPase en suivant la chronologie du cycle catalytique, nous avons déjà eu l'occasion de montrer de semblables réorganisations et ce en quoi elles sont importantes pour le fonctionnement de l'enzyme. La structure $\text{E2}(\text{TG})$ ne présente que peu de différences avec la forme E2.MgF_4 . Le domaine A y est cependant légèrement moins rapproché des domaines N et P (Figure 9).

Des informations significatives ont été apportées récemment concernant l'état de protonation dans la forme E2 des résidus carboxyliques responsables, dans la forme E1, de la fixation de Ca^{2+} par l'ATPase. Pour que la structure E2 dépourvue de Ca^{2+} soit stable, on conçoit intuitivement qu'il faille que ces résidus soient protonés; selon (Obara et al. 2005), la présence de charges négatives dans une région hydrophobe telle que la membrane du réticulum imposerait un coût énergétique supérieur à 100 kcal par mol. Or ces résidus sont séparés du milieu aqueux par une « barrière » largement formée de résidus hydrophobes, et ils ne peuvent donc pas être en équilibre acido-basique dynamique avec le milieu aqueux (Møller et al. 2005). Il faut donc que les ions Ca^{2+} soient bel et bien remplacés de façon stable par des protons.

Nous avons vu précédemment que l'équilibre $\text{E2} \leftrightarrow \text{E1}$ était déplacé vers la forme E2 à pH acide : ceci est bien cohérent avec l'idée que sur E2, certains résidus carboxyliques critiques soient protonés (Pick and Karlsh 1982). Et ceci nous ramène également aux études déjà citées de la fixation de Ca^{2+} en fonction du pH de Forge et collaborateurs, qui proposaient déjà que la forme dépourvue de calcium puisse fixer trois protons, dont deux devaient se dissocier avant que le premier calcium ait une chance de se fixer, le troisième proton devant lui aussi se dissocier pour permettre la fixation du deuxième calcium (Forge et al. 1993a; b).

L'analyse de la structure cristallographique E2 ne permet pas de voir directement l'état de protonation des résidus précédemment ligandés au Ca^{2+} , car sa résolution est trop faible. En revanche on peut arriver à de telles informations grâce à des simulations électrostatiques basées sur le calcul de la différence d'enthalpie libre entre formes protonées et formes non protonées (à condition que la résolution soit tout de même suffisante, notamment pour distinguer les molécules d'eau (Bashford and Karplus 1990; Yang et al. 1993; Berneche and Roux 2002)). Après de tels calculs, Sugita et al suggèrent que dans la forme E1Ca_2 , les résidus E58 et E908 sont très vraisemblablement protonés également. Ceci a des conséquences structurales importantes car la protonation de Glu58 permet de stabiliser le site II qui lui est voisin, et la protonation de Glu908 permet de stabiliser le site I, voir Figure 17A et (Sugita et al. 2005).

Notons que ces calculs n'auraient pas été possibles à partir de la première forme E2 cristalline obtenue en absence de Ca^{2+} et en présence de thapsigargine (E2.TG) (Toyoshima and Nomura 2002), car sa résolution était trop faible (3.1 Å). Le calcul a été rendu possible par l'existence d'un nouveau cristal de l'ATPase, obtenu en absence de Ca^{2+} et en présence de thapsigargine et d'un autre inhibiteur, le 2,5-di-*tert*-butyl-1,4-dihydroxybenzene (ou BHQ). Cette nouvelle structure a une meilleure résolution que la précédente (2.4 Å) et permet de visualiser cinq molécules d'eau aux voisinage des sites de fixation des Ca^{2+} (ainsi que plusieurs phospholipides) (Obara et al. 2005). C'est elle qui a permis de prédire l'état de protonation des résidus en E2.

Toyoshima et al. et Olesen et al. considèrent tous que ces protons liés à l'ATPase en E2 sont probablement contre-transportés, en échange avec le Ca^{2+} , tout comme l'ATPase

Na^+/K^+ échange du K^+ contre du Na^+ (Glynn 1993). Notons incidemment que prouver expérimentalement l'existence d'un couplage entre transport actif de Ca^{2+} et expulsion de H^+ et déterminer la stoechiométrie de cet échange ne sont pas des choses triviales, car les membranes sont relativement perméables aux protons : seules des expériences de transport par des ATPases reconstituées en liposomes (imperméables aux protons) ont permis d'établir sans ambiguïté l'existence de ce contre-transport (Yu et al. 1994), et de suggérer que, selon le pH, 2 ou 3 protons sont transportés en échange des 2 Ca^{2+} .

L'analyse des changements de protonation des résidus impliqués dans la fixation des ions Ca^{2+} a été réalisée à partir de la structure de E2(TG, BHQ) et de la structure de E1 Ca_2 . Quatre résidus sont protonés dans la structure E2(TG, BHQ) : E309, E771, D800 et E908 (Obara et al. 2005) alors que seulement deux sont protonés dans la structure E1 Ca_2 (Sugita et al. 2005). Il est donc tentant de conclure à un contre-transport de 2 protons pour 2 Ca^{2+} . Mais il n'est malheureusement pas possible de savoir avec certitude d'où viennent ces protons : il est tout à fait possible que certains protons se fixent à partir de la lumière du réticulum et qu'ils repartent dans cette même lumière après échange contre les Ca^{2+} . De même, étant donné que 5 molécules d'eau sont décrites dans E2(TG, BHQ) alors que seulement 2 molécules d'eau ont été trouvées dans la forme E1 Ca_2 , il pourrait être séduisant de penser à un contre-transport d'eau, mais il est possible que ces molécules d'eau arrivent et repartent du même endroit, sans qu'il y ait flux net d'eau de part et d'autre de la membrane. Quoi qu'il en soit, les processus de protonation et d'hydratation ont des rôles structuraux à part entière.

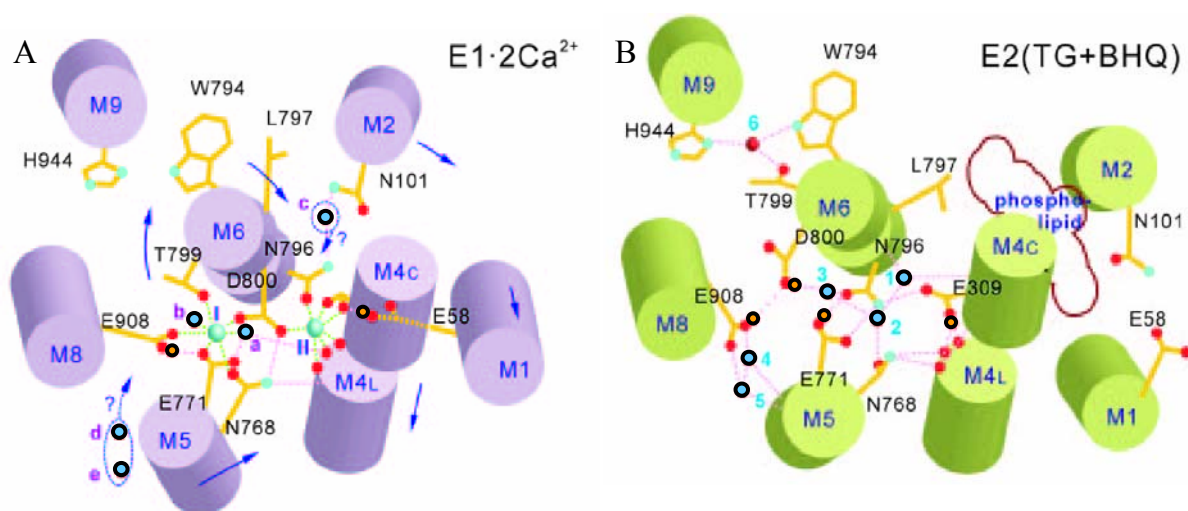


Figure 17. Protonation des résidus impliqués dans la fixation des ions Ca^{2+} .
Figure adaptée de (Obara et al. 2005). Les molécules d'eau sont représentées en bleu cerclé de noir, les protons en orange cerclé de noir. Les flèches représentent les mouvements probables des hélices ou possibles des molécules d'eau.

Notons que la présence de BHQ dans cette structure, en plus de la TG, ne modifie pas significativement la structure générale de l'ATPase en absence de Ca^{2+} . Le BHQ se fixe entre les segments M1 et M4, en établissant des liaisons hydrogènes avec le carboxyle de l'Asp59 (sur M1) et le carbonyle de Pro308 (sur M4). Le fait que les structures trouvées en présence d'inhibiteurs divers de l'ATPase (TG, TG+BHQ ou BHQ seul) soient voisines donne plutôt confiance dans l'idée que ces structures représentent bien une conformation significative pour l'ATPase non inhibée. Nous reviendrons brièvement sur ce point, néanmoins, dans le chapitre III. Enfin, notons qu'en présence de BHQ et de TG, quelques phospholipides sont en outre décrits dans le cristal. L'un d'entre eux (que les auteurs modélisent comme étant une phosphatidyl-éthanolamine endogène), observé dans cette forme E2, ne semble pas avoir la place d'interagir avec l'ATPase lorsque celle-ci est dans ses autres conformations.

L'amélioration de la résolution liée à la présence du BHQ a permis également de corriger la position de la chaîne latérale du Glu309. Ce résidu, que l'on croit très important pour l'occlusion de Ca^{2+} (il est réputé contrôler l'accès des ions Ca^{2+} à partir du côté cytosolique), présenterait en E2 sa chaîne latérale vers l'intérieur de la protéine (Obara et al. 2005), et non pas vers l'extérieur comme précédemment affirmé en 2002 (Toyoshima and Nomura 2002). Incidemment, cela affaiblit l'idée, présentée en 2002, que le Ca^{2+} puisse interagir *directement* avec la forme E2, *via* sa fixation à faible affinité sur cette chaîne latérale (cf ci-dessus la querelle « fixation de calcium puis transition vers E1, *versus* transition E2-E1 puis fixation de Ca^{2+} »).

Chapitre II : Contenu de la présente thèse

Chapitre II : Contenu de la présente thèse

Nous venons de voir que l'étude des différentes étapes catalytiques de l'ATPase- Ca^{2+} avait une longue histoire et faisait appel à des techniques très diverses. Je décrirai d'abord celles de ces techniques que j'ai le plus utilisées pendant cette thèse, et ce sera mon chapitre «Matériel et Méthodes», le chapitre III. A titre d'illustration de ces techniques, j'ai en outre incorporé à ce chapitre le résultat d'un certain nombre d'expériences qui n'ont pas encore complètement été analysées, et donc n'ont pas encore été soumises à publication, mais qui peuvent néanmoins avoir déjà un certain intérêt.

Dès mon arrivée au laboratoire, en septembre 2002, j'ai été associé à des travaux expérimentaux mettant en pratique quelques unes de ces techniques, et cela a constitué pour moi une initiation très concrète à l'analyse fonctionnelle de l'ATPase- Ca^{2+} . Ma contribution la plus significative à ces travaux a consisté à mettre en œuvre des mesures de cinétique préstationnaire, visant à comprendre l'effet sur le fonctionnement de l'ATPase d'un certain nombre de perturbations de la chaîne polypeptidique. Nous avons ainsi montré que la protéolyse ménagée du segment reliant M2 au domaine A ralentit tout particulièrement la vitesse de phosphorylation par le phosphate inorganique et la vitesse de déphosphorylation, donc déstabilise sans doute l'état de transition formé lors de la réaction $\text{E2} \rightarrow \text{E2P}$. Ceci traduit probablement le fait que le positionnement précis du domaine A par rapport au site catalytique est absolument essentiel à cette étape-là de la réaction ATPasique (Lenoir et al. 2004a). Nous avons aussi étudié l'effet sur le fonctionnement de l'ATPase d'une mutation dans la boucle L6-7, qui occupe une position stratégique dans l'ATPase entre domaine membranaire et domaine de phosphorylation. J'ai pu par exemple réaliser des mesures de phosphorylation par l'ATP, sur des échelles de temps plus courtes que la seconde, qui ont montré que cette mutation ralentissait le changement de conformation qui permet au site actif de l'ATPase de réagir avec l'ATP, lors de la fixation de calcium sur ses sites membranaires, le changement de conformation « $\text{E2} \rightarrow \text{E1}$ » (Lenoir et al. 2004b). Tout cela constituera mon chapitre IV.

Ce travail se faisait dans un contexte international où les données expérimentales accumulées pendant les trois décennies précédentes pouvaient enfin commencer à être confrontées aux structures à haute résolution qui venaient tout juste d'être obtenues au Japon par diffraction des rayons X. Les premiers moments du dialogue de fonctionnalistes avec les structuralistes dévoilant l'architecture générale de leur protéine favorite sont toujours passionnants, et les détails atomiques ainsi révélés sont fascinants. Ma thèse était justement financée par un contrat Human Frontier avec l'artisan de ces nouvelles structures, Chikashi Toyoshima. A l'été 2003, à une réunion de la FASEB, C. Toyoshima nous montra la nouvelle structure qu'il venait de résoudre, celle du complexe formé par l'ATPase, en présence de calcium, avec ADP et fluoroaluminate, un complexe dont on espérait qu'il mimerait l'état de transition formé pendant la phosphorylation de l'enzyme par l'ATP. Entre autres choses, ce complexe permettait de comprendre le mécanisme moléculaire d'un phénomène connu de tous, l'« occlusion » membranaire transitoire des ions calcium dans le dérivé phosphorylé, avant leur relargage de l'autre côté de la membrane.

Mais C. Toyoshima nous présenta également une autre structure, très voisine, obtenue en présence d'un simple analogue non hydrolysable d'ATP, l'AMPPCP, et dans laquelle le Ca^{2+} semblait de nouveau être occlus. Ceci fut une grande surprise pour nous car nous avions en tête les mesures de dissociation de calcium précédemment réalisées au laboratoire par S.Orlowski, qui avait observé que ce même analogue, l'AMPPCP, n'affectait que de façon marginale la capacité du Ca^{2+} à se dissocier de ses sites. Nous nous sommes quittés après avoir promis, de notre côté, de reprendre de façon systématique ces études de dissociation du Ca^{2+} en présence d'AMPPCP. Mais nous avons bientôt pu confirmer et étendre l'observation initiale de S. Orlowski.

Mon travail de thèse a sans doute basculé à cette réunion de la FASEB pour y prendre un tour plus personnel. Nous avons brutalement quitté la fascination originelle et compréhensible du fonctionnaliste pour les nouvelles structures, pour devenir plus suspicieux à leur égard. Nous avons réalisé que les contraintes expérimentales liées à la cristallisation des protéines, et *a fortiori* des protéines membranaires, devaient inciter à une certaine prudence. Les conditions de cristallisation sont en effet très éloignées des conditions expérimentales habituelles des tests fonctionnels, et bien évidemment encore plus éloignées des conditions physiologiques. Il nous a alors semblé que le meilleur rôle que nous pouvions peut-être jouer, à ce moment particulier de l'histoire de notre champ scientifique, compte tenu de ce que nous savions faire, et avec le soutien de C. Toyoshima, serait de poser la question de la pertinence de ces structures d'un point de vue fonctionnel, avant que la fascination compréhensible évoquée plus haut ne transforme en dogmes scientifiques des images peut-être en partie artéfactuelles.

Plus spécifiquement, nous avons donc tenté de résoudre le paradoxe posé par cette structure cristalline de l'ATPase- Ca^{2+} qui, en présence d'un analogue de nucléotide, était décrite comme empêchant toute dissociation de Ca^{2+} de ses sites. Nous avons pu montrer, grâce à certaines des techniques décrites au chapitre III, que ce n'était pas du tout le cas dans les conditions ordinaires de fonctionnement de l'ATPase, et que le paradoxe était dû aux conditions de cristallisation, où la concentration de calcium est extrêmement élevée (Picard et al. 2005b). Un court séjour dans le laboratoire au Danemark de Poul Nissen, qui sait désormais lui aussi cristalliser l'ATPase- Ca^{2+} , a permis de nous convaincre définitivement que la structure publiée pour cette forme E1.AMPPCP devait en fait être corrigée : ce n'était pas le Mg^{2+} physiologique qui accompagnait l'AMPPCP dans cette structure, c'était un ion Ca^{2+} non physiologique, aux conséquences fonctionnelles imprévues, et qui reflétait les conditions extrêmes de la cristallisation. La description de ce travail constituera le début de mon chapitre V.

Dans le même ordre d'idée, nous avons ensuite étudié l'effet de la présence d'inhibiteurs de l'ATPase lors de certaines cristallogénèses. Ces inhibiteurs sont utilisés pour stabiliser l'enzyme dans ses conformations dépourvues de Ca^{2+} . Nous avons étudié leur effet (et en premier lieu l'effet de la thapsigargine) sur l'accessibilité des sites Ca^{2+} du côté luminal, et montré que l'utilisation de ces inhibiteurs sur des formes supposées mimer plus ou moins le dérivé phosphorylé E2P diminuait de beaucoup les chances de pouvoir un jour observer *ouverte* la voie de passage du calcium de ses sites membranaires jusqu'au milieu aqueux luminal (Picard et al. 2005c, *accepté dans J Biol Chem*). Ceci constituera la deuxième partie de mon chapitre V. Tous les résultats de ce chapitre tendent donc à mettre en garde contre la tentation de vouloir sur-interpréter les magnifiques structures cristallographiques désormais disponibles, de leur faire dire plus que ce qu'elles ne montrent réellement.

Enfin, mon travail de thèse n'a pas négligé le fait que l'ATPase- Ca^{2+} était une protéine membranaire, qui dans différentes occasions, devait être solubilisée et extraite de sa membrane d'origine (ne serait-ce que pour sa purification avant éventuelle cristallisation). Dans mon chapitre VI, je ferai part de nos efforts pour aider, plus généralement, à optimiser la manipulation de ces protéines membranaires solubilisées grâce à l'utilisation de polymères amphiphiles. Cette classe de polymères (baptisés amphipols) a été synthétisée (par C. Tribet et J.-L. Popot, à l'ESPCI et à l'IBPC), dans le but de pouvoir manipuler les protéines membranaires sous forme solubilisée, sans toutefois être confrontés aux inconvénients inhérents à l'utilisation des détergents (inhibition de l'activité de certaines enzymes membranaires, voire inactivation pure et simple de celles-ci). Nous avons montré que dans le cas de notre protéine favorite, l'ATPase- Ca^{2+} , ces polymères ne remplacent pas les détergents du point de vue de la solubilisation des membranes, mais qu'en revanche ils peuvent être utiles pour éviter à ces membranes de flocculer au cours du temps (Picard et al. 2004).

Par ailleurs, après solubilisation par des détergents classiques, ces polymères sont connus pour avoir la capacité de protéger les protéines membranaires vis à vis de leur dénaturation irréversible, mais sur l'ATPase- Ca^{2+} , ils ont néanmoins un effet inhibiteur réversible. Nous avons étudié différents amphipols, et en particulier un caractère qui n'avait pas été remarqué jusque là, leur capacité à ralentir la vitesse de dissociation du calcium à partir de l'ATPase solubilisée et mise en présence de ces amphipols. Nous avons alors pu proposer une explication générale pour la corrélation apparente que nous avons observée, pour ces divers amphipols, entre protection vis-à-vis d'une inactivation irréversible et (pour certaines protéines membranaires mais pas toutes) inhibition réversible de leur cycle catalytique (Picard et al. 2005a, *accepté dans Biochemistry*).

Chapitre III : Matériel et Méthodes, **avec en outre quelques résultats non encore soumis à publication**

1. Caractérisation sommaire des membranes préparées à partir du réticulum sarcoplasmique de lapin.
2. Activité ATPasique de ces membranes.
Exemple : dépendance en pCa de l'activité hydrolytique de l'ATPase solubilisée
3. Protéolyse ménagée éventuelle à la protéinase K et analyse par SDS-PAGE.
Application : effet de la TG sur la protéolyse de l'ATPase en absence de Ca^{2+}
4. Phosphorylation de l'ATPase par le $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ ou le $[^{32}P]Pi$, mesurée par filtration après arrêt acide.
5. Phosphorylation de l'ATPase par le $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ ou le $[^{32}P]Pi$, mesurée après électrophorèse de la protéine.
Exemple : affinité apparente pour le Pi lors d'une phosphorylation en absence de Ca^{2+} .
6. Mesures de fluorescence à l'équilibre.
Application : changements de fluorescence intrinsèque pour une ATPase mutée dans l'un de ses sites Ca^{2+} , ou mutée au niveau de l'un de ses résidus Trp.
7. Mesure optique d'une réaction sur de courtes échelles de temps, après mélange rapide et flux interrompu (« stopped-flow »).
Application : différenciation spectroscopique des sous-étapes impliquées dans la dissociation du Ca^{2+} .
8. Mesure par fluorescence de la vitesse de dissociation du Ca^{2+} , en présence de « quin2 ».
Exemple : calibration de la mesure.
9. Transport ou fixation non covalente de ligand, mesurés par filtration manuelle.
10. Filtration rapide
Exemple : vitesse de dissociation du $^{45}Ca^{2+}$ initialement lié à l'ATPase. Comparaison avec la méthode au quin2.
11. Mesure chimique d'une réaction sur de courtes échelles de temps, après mélange rapide et arrêt rapide de la réaction (« quench flow »).
Application : mesure de la vitesse à laquelle, lors de la dissociation du Ca^{2+} , l'ATPase cesse d'être phosphorylable par l'ATP.

Chapitre III : Matériel et Méthodes, **avec en outre quelques résultats non encore soumis à publication**

Nous avons vu dans l'Introduction que le fonctionnement de l'ATPase- Ca^{2+} pouvait être étudié suivant une grande variété de techniques. Je présenterai dans ce chapitre les techniques que j'ai utilisées pendant cette thèse. J'illustrerai ces techniques par des exemples ou des applications, correspondant, pour certaines, à des résultats non encore publiés ou soumis à publication, mais peut-être déjà dignes d'intérêt.

1. Caractérisation sommaire des membranes préparées à partir du réticulum sarcoplasmique de lapin.

Nos membranes sont préparées à partir de muscle de lapin selon un protocole déjà décrit dans (Champeil et al. 1985). Elles se referment spontanément sous forme de vésicules closes, de diamètres compris entre 60 et 200 nm, très riches en protéines (cf la photo de microscopie électronique après cryofracture montrée sur la Figure 1, à gauche). Parmi ces protéines, l'une est très majoritaire, c'est l'ATPase SERCA1a (cf le gel d'électrophorèse montré sur la Figure 1, à droite). On estime que les membranes de réticulum sarcoplasmique contiennent de l'ordre de 60-70 % d'ATPase. L'ATPase ayant une masse molaire voisine de 110 kDa, ceci correspond à environ 5 à 6 nanomoles d'ATPase active par mg de protéine membranaire (une petite fraction des ATPases est toujours dénaturée).

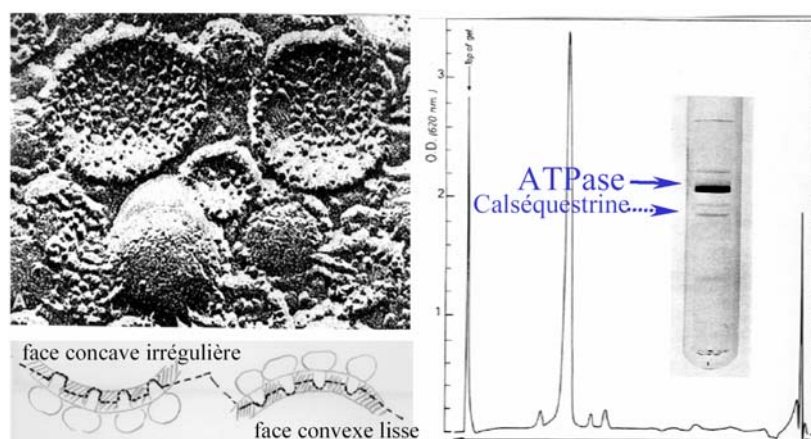


Figure 1. Microscopie électronique de préparation de réticulum sarcoplasmique après cryofracture (à gauche), d'après (Scales and Inesi 1976). Gel d'électrophorèse et densitométrie de ce gel (DO à 620 nm) pour les protéines de ces membranes (à droite), d'après (Champeil et al. 1978)

Au laboratoire, le contenu total en protéines de ces membranes est quantifié à partir de la simple absorption, en présence de 1 % SDS, des résidus aromatiques de ces protéines : en présence de SDS, une solution de densité optique à 280 nm égale à 1 contient 1 mg/ml de protéines.

2. Activité ATPasique de ces membranes

Une première méthode de dosage de l'activité ATPasique consiste à mesurer la variation du pH au cours du temps. En effet l'hydrolyse de l'ATP conduit à une libération de protons, qui accompagne la formation d'ADP et de phosphate inorganique (la stœchiométrie H^+/ATP variant avec le pH et la concentration de Mg^{2+}). Pour de telles mesures, il faut évidemment veiller à ne pas trop tamponner la solution (on travaille alors typiquement dans 5 mM de Mops-Tris, à pH 7, KCl 100 mM et Mg^{2+} 5 mM). Il faut aussi veiller à ce que le Ca^{2+} s'accumulant dans la lumière du réticulum n'inhibe pas le fonctionnement de l'ATPase: dans le cadre de ce protocole expérimental, on utilise souvent de l'oxalate, qui complexe et fait précipiter à l'intérieur des vésicules le Ca^{2+} qui vient d'y être transporté.

Le plus souvent, cependant, l'activité ATPasique de nos membranes a été mesurée au moyen d'un dosage par « enzymes couplées », dans lequel l'hydrolyse de l'ATP est couplée à deux autres réactions enzymatiques, comme décrit dans la Figure suivante:

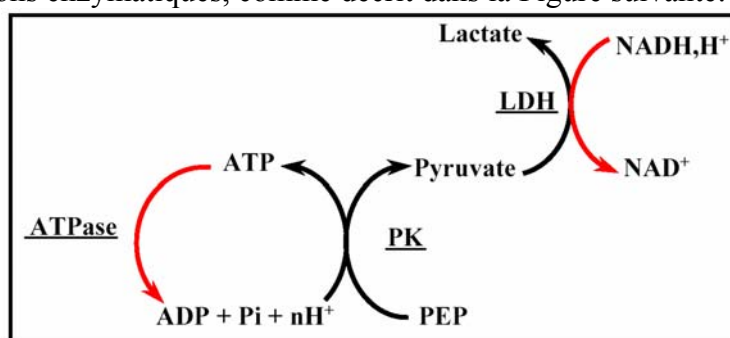


Figure 2. Dosage d'une activité ATPasique par enzymes couplées

Chaque fois que l'ATPase hydrolyse de l'ATP et produit donc une molécule d'ADP, la pyruvate kinase (PK) catalyse la déphosphorylation du phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate pendant que la molécule d'ADP est retransformée en ATP. Cette réaction (dite « régénératrice d'ATP ») permet de maintenir constante la concentration en ATP dans le milieu. A son tour, le pyruvate formé est réduit en lactate grâce à la lactate déshydrogénase (LDH) et à l'oxydation d'une molécule de NADH (en NAD^+). En suivant la diminution de densité optique à 340 nm, longueur d'onde à laquelle le NADH absorbe, on peut estimer la diminution de la concentration de NADH par unité de temps, donc la vitesse de production d'ADP, donc la vitesse d'hydrolyse d'ATP. On rapporte en général cette vitesse d'hydrolyse à la quantité de protéines présentes, et on l'exprime donc en $(\mu\text{mol d'ATP hydrolysé}) \cdot (\text{mg de protéine})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

L'activité ATPasique est souvent mesurée dans le milieu suivant: KCl 100 mM, Mg^{2+} 1 mM, Ca^{2+} 0,1 mM et Tes-Tris 50 mM (pH 7,5 et 20°C), et 1-5 mM d'ATP. Le fonctionnement du système d'enzymes couplées requiert aussi typiquement la présence de 1 mM de PEP, 0,1 mg/ml de pyruvate kinase (c'est la pyruvate kinase qui est en général l'enzyme limitante), 0,1 mg/ml de lactate déshydrogénase et 0,15 mM de NADH. L'ATPase est ajoutée à une concentration pouvant varier entre 4 et 10 μg de protéine/ml. Enfin, comme déjà dit précédemment, il est indispensable de perméabiliser les membranes car le Ca^{2+} s'accumulant dans la lumière du réticulum aurait un effet inhibiteur sur le fonctionnement de la pompe. Cette perméabilisation peut être réalisée en utilisant un ionophore (classiquement, la calcymicine (A23187, à 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ou encore un détergent non inhibiteur (classiquement le $C_{12}E_8$, à 0,5 mg/ml). La Figure 3 montre de telles mesures, dans lesquelles l'activité de l'ATPase solubilisée a été mesurée à diverses concentrations de Ca^{2+} libre (obtenues grâce à diverses additions d'EGTA -un chélateur du calcium- puis diverses ré-additions de Ca^{2+}).

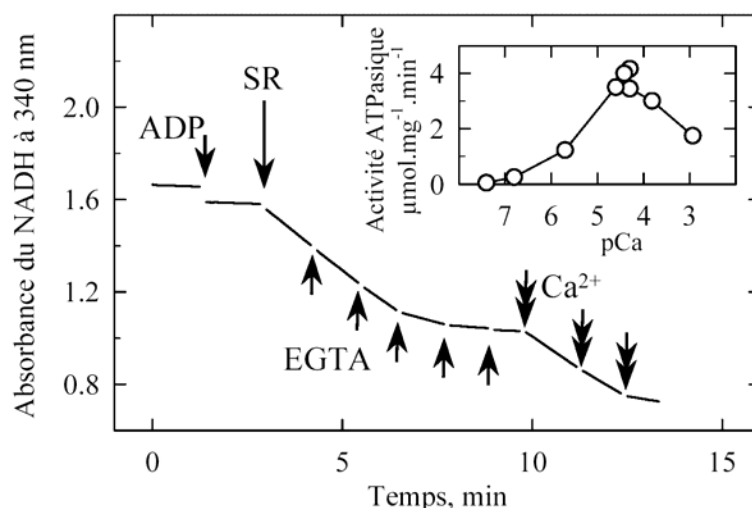


Figure 3. Activité ATPasique en présence de 0,5 mg/ml de C₁₂E₈ et à diverses concentrations de Ca²⁺ libre.

Ici, le milieu contenait initialement 100 μM de Ca²⁺ total et 50 μM d'EGTA, ainsi que 1 mM d'ATP. Une première addition d'ADP (10 μM) montre que le système régénérateur fonctionne bien et retransforme rapidement en ATP tout ADP apparaissant dans le milieu. On ajoute alors 5 μg/ml de SR, et on détecte la vitesse à laquelle l'ATPase solubilisée hydrolyse l'ATP. On peut ensuite ajouter successivement diverses concentrations d'EGTA, jusqu'à inhiber complètement l'activité ATPasique, puis diverses concentrations de Ca²⁺ supplémentaire (doubles flèches), pour réverser cette inhibition. La dépendance en pCa de cette activité est portée en «inset». Notons (on y reviendra) qu'une concentration trop forte de Ca²⁺, millimolaire, inhibe l'activité ATPasique.

3. Protéolyse ménagée éventuelle à la protéinase K et analyse par SDS-PAGE

Lorsque nous avons souhaité soumettre l'ATPase à la protéolyse par la protéinase K, les membranes de réticulum sarcoplasmique ont été suspendues à la concentration de 2 mg/ml dans un tampon Mops-NaOH (pH 6,5) contenant soit 5 mM de Mg²⁺ et 0,5 mM d'EGTA, soit 5 mM de Mg²⁺ et des concentrations variables de calcium, éventuellement en présence d'AMPPCP ou d'un mélange ADP/AlF₄. Les membranes sont alors incubées avec 0,03 mg/ml de protéinase K pendant des durées variables (typiquement jusqu'à 60 minutes). La réaction est stoppée par l'ajout de 0,5 ou 1 mM de PMSF (phénylméthylsulfonyl fluorure). Les échantillons sont alors incubés dans de la glace pendant 15 minutes, puis traités (typiquement 4 μl dans 40 μl) dans un tampon de dénaturation contenant de l'urée, pendant 70 secondes (le traitement à l'urée s'est avéré efficace pour éviter les agrégats protéiques qui pourraient se former à 100 °C, température nécessaire pour inactiver complètement la protéase (Soulié et al. 1996; Soulié et al. 1998); le tampon contenant l'urée (8.3 M) est gardé congelé en petites aliquotes). Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel dénaturant de type Laemmli (Laemmli 1970), en fait sur un gel concentrant (stacking gel) suivi d'un gel séparateur (separating gel). Le gel concentrant est constitué de 5 % d'acrylamide (avec un ratio acrylamide/bisacrylamide de 29:1), 125 mM de Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % de SDS, 0,1 % de persulfate d'ammonium et 0,1 % de TEMED. Le gel séparateur est constitué de 12 % d'acrylamide (avec un ratio acrylamide/bisacrylamide de 29:1), 375 mM de Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % de SDS, 0,1 % de persulfate d'ammonium et 0,04 % de TEMED. Le tampon de migration contient 25 mM de Tris-Cl, 250 mM de glycine et 1 % de SDS (pH 8,6). Souvent, on ajoute 1 mM de Ca²⁺ dans le tampon des deux gels, ce qui modifie légèrement la vitesse de migration des peptides susceptibles de se replier de façon plus compacte en présence de Ca²⁺.

et permet donc parfois la résolution de certaines bandes composites. Après 1 h de migration (150 V, 25 mA par gel), les protéines sont révélées avec du Bleu de Coomassie (R-250 à 0,5 g/l), puis les gels sont décolorés par une solution de méthanol 10 %, acide acétique 10 % et glycérol 1 %. Je mentionnerai ici une application de ces protéolyses ménagées.

Effet de la thapsigargine sur la protéolyse de l'ATPase en absence de Ca^{2+} .

Comme on le reverra un peu plus loin au chapitre IV, la protéinase K, ajoutée aux membranes de SR en absence de Ca^{2+} , coupe initialement l'ATPase en deux points seulement : à la liaison T243-E243 (et cela engendre un complexe dit « p83C/p28N »), et à la liaison L119-K120 (et cela engendre un complexe dit « p95C/p14N »). En 2001, Danko et al. ont rapportés que le profil de coupure en absence de Ca^{2+} était passablement indifférent à la présence de thapsigargine (TG), un inhibiteur de l'ATPase se fixant spécifiquement en absence de Ca^{2+} . Ces résultats confortaient l'idée que la TG pouvait être utilisée pour stabiliser et « révéler » la fameuse conformation « E2 » de l'ATPase dépourvue de Ca^{2+} .

Reprenant ces expériences, nous avons observé que contrairement à la description initiale (mais conformément à ce qui est maintenant reconnu, cf. (Hua et al. 2005)), la présence de TG modifiait le profil de coupure de l'ATPase. Ceci est d'abord montré sur la Figure 4A (pour laquelle nous remercions Carole Gauron et Guillaume Lenoir pour leur aide lors de l'électrophorèse).

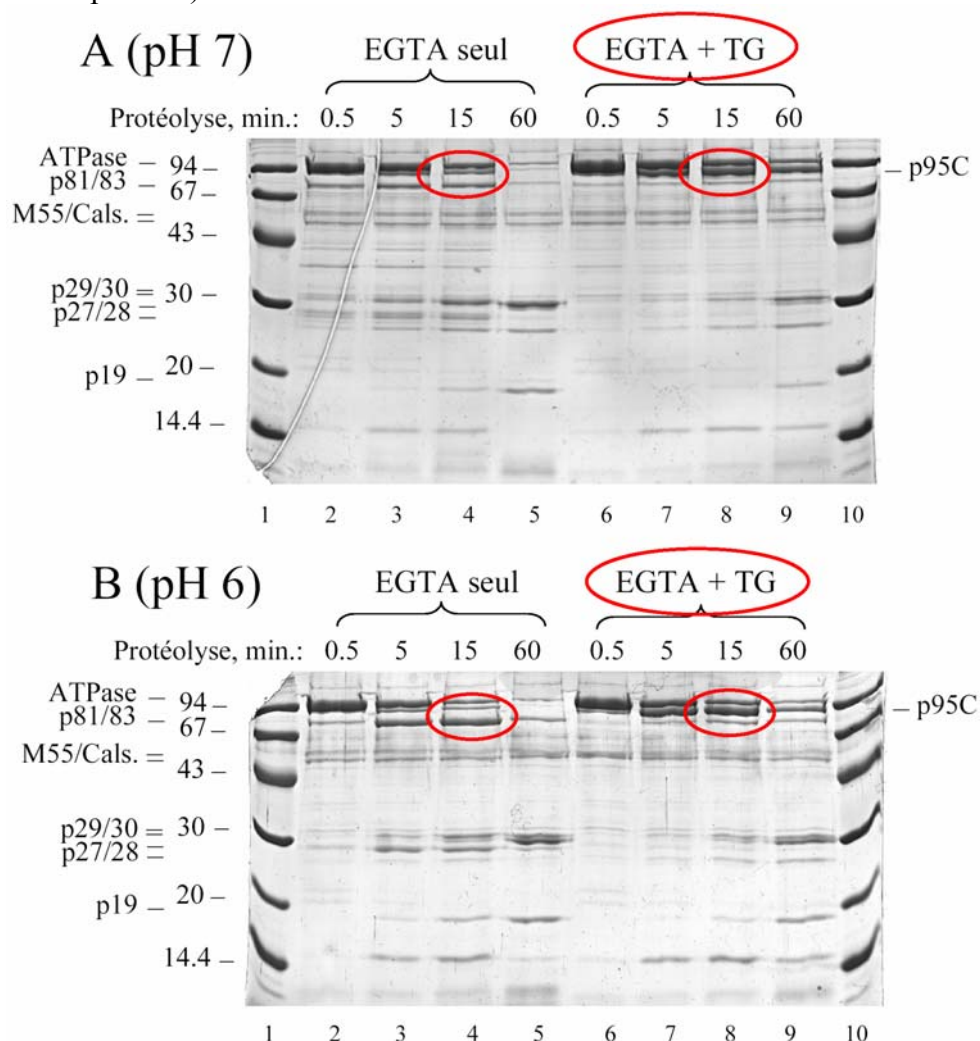


Figure 4. Protéolyse de l'ATPase dépourvue de Ca^{2+} par la protéinase K: effet de la TG, à pH 7 ou pH 6.

Dans cette expérience, les membranes de SR (2 mg/ml) ont été traitées à 20°C pendant des temps variables par 0.03 mg/ml de protéinase K en présence de 5 mM de Mg^{2+} et de 0,5 mM d'EGTA, dans un tampon contenant 50 mM de Mops-Tris à pH 7, en absence (puits 2-5) ou en présence (puits 6-9) de 0.02 mg/ml de TG. On voit que la bande correspondant au fragment p95C devient, en présence de TG, le produit principal de la protéolyse. Comme la protéolyse globale de l'ATPase est en fait légèrement *ralentie* par la TG, cette accumulation ne peut pas être due seulement à une accélération de la coupure en L119-K120, mais elle est forcément due à un *ralentissement* relatif très important de la coupure en T242-E243 (celle qui engendre p83C).

On pourrait penser que ce résultat reflète le fait que l'ATPase dépourvue de Ca^{2+} explore en fait un grand nombre de conformations en échange dynamique, dont seulement certaines correspondent à la forme « E2 » canonique, et que c'est cette forme-là, plus résistante à la protéolyse, qui est stabilisée par la TG. De fait, il est assez généralement admis qu'à pH 7, l'ATPase dépourvue de Ca^{2+} passe la moitié seulement de son temps dans sa configuration E2, et l'autre moitié dans une configuration « de type E1 », celle à laquelle les ions Ca^{2+} pourront venir se fixer avec une forte affinité à partir du milieu cytosolique.

Cette interprétation de l'effet de la TG sur la protéolyse, cependant, se heurte aux résultats montrés sur le panneau B de la Figure 4. En effet, ici, dans la même expérience, la protéolyse a été répétée dans des conditions identiques mais à un pH différent, pH 6 (tamponné avec 50 mM de Mes-Tris) au lieu de pH 7. Or, l'effet de la TG est tout aussi prononcé qu'à pH 7, voire davantage, alors qu'à pH 6 et en absence de Ca^{2+} l'ATPase est supposée passer l'essentiel de son temps dans la conformation E2. Ce résultat suggère donc que c'est bien la TG qui fait basculer l'ATPase dépourvue de Ca^{2+} dans une configuration moins susceptible à la coupure protéolytique, sans doute parce que plus figée : la TG n'a pas qu'un rôle de *révéléateur* de la conformation E2, mais elle « gèle » en partie la dynamique de la protéine, et fait bien apparaître un état *différent* de la chaîne polypeptidique dans l'ATPase dépourvue de Ca^{2+} . Ceci avait déjà été suggéré par des expériences indirectes (et d'interprétation très risquée, selon nous) du groupe de Lee (Logan-Smith et al. 2002) et nous aurons des échos de cela dans la deuxième partie du chapitre V de cette thèse. Notons d'ailleurs que nous avons observé ce ralentissement de la coupure en T242-E243 en présence des autres inhibiteurs de l'ATPase dont on reparlera plus loin, « BHQ » et « CPA » (résultats non montrés ici).

4. Phosphorylation de l'ATPase par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ou le $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$, mesurée par filtration après arrêt acide

- Phosphorylation par l'ATP, en présence de Ca^{2+}

La phosphorylation de la protéine par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ est en général mesurée à concentration relativement faible de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, pour améliorer le rapport signal sur bruit de la mesure. Mais la forte activité hydrolytique de l'ATPase- Ca^{2+} fait alors disparaître assez vite le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Les mesures de phosphorylation à l'état stationnaire, faites « à la main », sont donc en général réalisées dans de la glace, pour ralentir la vitesse d'hydrolyse globale de l'ATP. En outre, dans ces conditions, la déphosphorylation $\text{E2P} \rightarrow \text{E2}$ est proportionnellement plutôt plus ralentie que les autres étapes du cycle, ce qui permet une accumulation maximale du dérivé phosphorylé à l'état stationnaire.

Typiquement, les vésicules de SR sont suspendues à une concentration de 0,2 mg/ml dans un tampon 50 mM de Mops-Tris (pH 7), 100 mM de KCl et 5 mM de Mg^{2+} , en présence de calcium. La phosphorylation est initiée par l'addition de $[\gamma-^{32}P]ATP$ (classiquement 5 μM , à radioactivité spécifique 0,5 mCi/ μmol). La réaction est alors arrêtée en milieu acide, en suivant la procédure décrite un peu plus bas.

Si, après phosphorylation à l'état stationnaire, on veut mesurer la déphosphorylation de l'enzyme, on peut déclencher celle-ci de différentes manières, par exemple par addition d'une concentration adéquate d'EGTA à partir d'une solution mère concentrée, ou encore par dilution dans un milieu contenant de l'ATP froid.

Si l'on veut suivre la vitesse de formation ou d'hydrolyse du dérivé phosphorylé au cours du temps, faire les mesures « à la main » ne suffit pas toujours, notamment à température ambiante : il faut passer à des mesures de « quench-flow » qui seront décrites plus loin.

- Phosphorylation par le P_i , en absence de Ca^{2+}

Le cycle catalytique d'hydrolyse d'ATP par l'ATPase- Ca^{2+} est réversible, et celle-ci a la capacité d'être phosphorylée par le phosphate inorganique lorsqu'elle est incubée en absence de Ca^{2+} (en présence d'EGTA). Cette phosphorylation par le P_i est favorisée en absence de KCl et à température élevée, et surtout en présence de diméthylsulfoxyde. Nous l'avons mesurée par exemple dans un tampon contenant 50 mM de Mops-Tris (pH 7 à température ambiante), 10 mM de Mg^{2+} , 1 mM d'EGTA, et 25 % de DMSO (v/v). La phosphorylation était alors initiée par l'addition de 200 μM de $[^{32}P]P_i$ (de radioactivité spécifique 0,5 mCi/ μmol) à une suspension de vésicules dont la concentration était de 0,2 mg/ml. L'arrêt de la réaction de phosphorylation se fait en milieu acide, comme après phosphorylation par l'ATP.

Si, après avoir atteint l'équilibre, on souhaite mesurer une vitesse de déphosphorylation, la réaction de déphosphorylation peut de nouveau être déclenchée de diverses manières, par exemple par l'ajout de P_i non radioactif en excès, ou de nouveau par dilution dans le milieu souhaité.

- Arrêt en milieu acide et filtration

Les réactions de phosphorylation peuvent être stoppées par ajout d'un mélange d'acide trichloroacétique (TCA, 150 mM final) et d'acide phosphorique (NaH_2PO_4 , 15 mM final). Un tel ajout est connu pour arrêter la réaction de phosphorylation tout en préservant l'intégrité de la liaison acylphosphate. Après cet arrêt acide, les milieux de réactions sont déposés sur un filtre en fibre de verre (type A/E, anciennement Gelman, désormais PALL): les vésicules, agrégées par le traitement acide, sont retenues sur le filtre, et le $[^{32}P]$ reste lié à l'enzyme de manière covalente. Le filtre est abondamment rincé, toujours en milieu acide, et sa radioactivité est alors comptée sur un compteur à scintillation.

5. Phosphorylation de l'ATPase par le $[\gamma-^{32}P]ATP$ ou le $[^{32}P]P_i$, mesurée après électrophorèse de la protéine.

Nous avons aussi mesuré des cinétiques de phosphorylation à partir de membranes de SR préalablement traités à la protéinase K pour réaliser une protéolyse ménagée de l'ATPase.

Les réactions de phosphorylation par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ou par le $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ ont été réalisées comme précédemment, mais pour pouvoir mesurer la phosphorylation des différents fragments d'ATPase présents dans ces membranes traitées, les échantillons arrêtés à l'acide ont été d'abord déposés sur gels SDS-PAGE, pour séparer les différents fragments.

En ce cas, après arrêt acide, on laisse reposer l'échantillon pendant 20 minutes sur de la glace (pour mieux encore le laisser s'agréger) et on le centrifuge (15000 rpm pendant 25 minutes, à froid). On se débarrasse du surnageant, que l'on remplace par un mélange TCA/ H_3PO_4 dilué 10 fois par rapport au mélange précédent (pour faciliter la resuspension ultérieure). On centrifuge à nouveau, comme précédemment (15000 rpm, pendant 25 minutes, à froid) et, de nouveau, on élimine le surnageant. Chaque culot est alors suspendu dans 250 μl d'un milieu contenant 150 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 2 % de SDS, 10 mM d'EDTA, 16 % de glycérol (v/v), 8 M d'urée, 0,8 M de β -mercaptoéthanol et 0,04 % de bleu de bromophénol (Sarkadi et al. 1986; Sarkadi et al. 1988; Menguy et al. 1998). La qualité de la resuspension est importante pour une bonne reproductibilité d'un échantillon à l'autre : on prend donc soin de vortexer chaque échantillon pendant une minute.

Les culots resuspendus sont alors prêts à être déposés sur gel SDS-PAGE, pour séparation des différents fragments. Mais ce gel n'est pas un gel Laemmli classique ; sa composition a été optimisée afin de permettre de minimiser l'hydrolyse du dérivé phosphorylé au cours de la migration (Sarkadi et al. 1986). Le gel de concentration contient 4 % d'acrylamide (avec une proportion acrylamide/bisacrylamide égale à 29/1), 65 mM de Tris H_3PO_4 (pH 5,5), 0,1 % de SDS, 2 % de persulfate d'ammonium et 0,1 % de TEMED. Le gel séparateur est un gel continu de 7 % d'acrylamide, contenant 65 mM de Tris H_3PO_4 (pH 6,5), 0,1 % de SDS, 0,4 % de persulfate d'ammonium et 0,05 % de TEMED. Les migrations électrophorétiques ont généralement lieu en chambre froide, pendant environ 3 h et à intensité constante de 10 mA par gel (70-80 V). Ces conditions de migration (électrophorèse en chambre froide et faible voltage) sont elles aussi destinées à limiter le plus possible la déphosphorylation des différents fragments pendant la migration. Les gels sont colorés et fixés pendant 10 minutes dans 40 % de méthanol, 10 % d'acide acétique et 0,1 % de bleu de Coomassie R-250. La décoloration est réalisée dans un mélange contenant 10 % d'acide acétique, 10 % de méthanol et 1 % de glycérol. Les gels sont ensuite séchés entre deux feuilles de cellophane comme d'habitude.

Mais à cette étape, on peut mesurer la radioactivité résiduelle associée à chaque bande protéique, en exposant un écran de détection (Phosphor Screen) à la radioactivité bêta émise par le ^{32}P . Cette radioactivité est alors déterminée en « relisant » l'écran grâce à un PhosphorImager (Molecular Dynamics). Des quantités connues de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ou de $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ sont incluses pour étalonnage.

La Figure 5 ci-dessous montre un exemple d'une telle mesure, réalisée avec G. Lenoir, destinée à mesurer l'affinité apparente avec laquelle différents fragments d'ATPase sont phosphorylés par le $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$, en absence de Ca^{2+} . On voit en haut à gauche l'autoradiogramme correspondant au gel en bas à gauche (qui, lui, est coloré au bleu de Coomassie). Le graphe de droite résume le résultat : le fragment «p95» (voir chapitre suivant) semble se phosphoryler aussi bien que l'ATPase intacte, en tout cas à l'équilibre, et par contre ce n'est pas le cas du fragment «p83C».

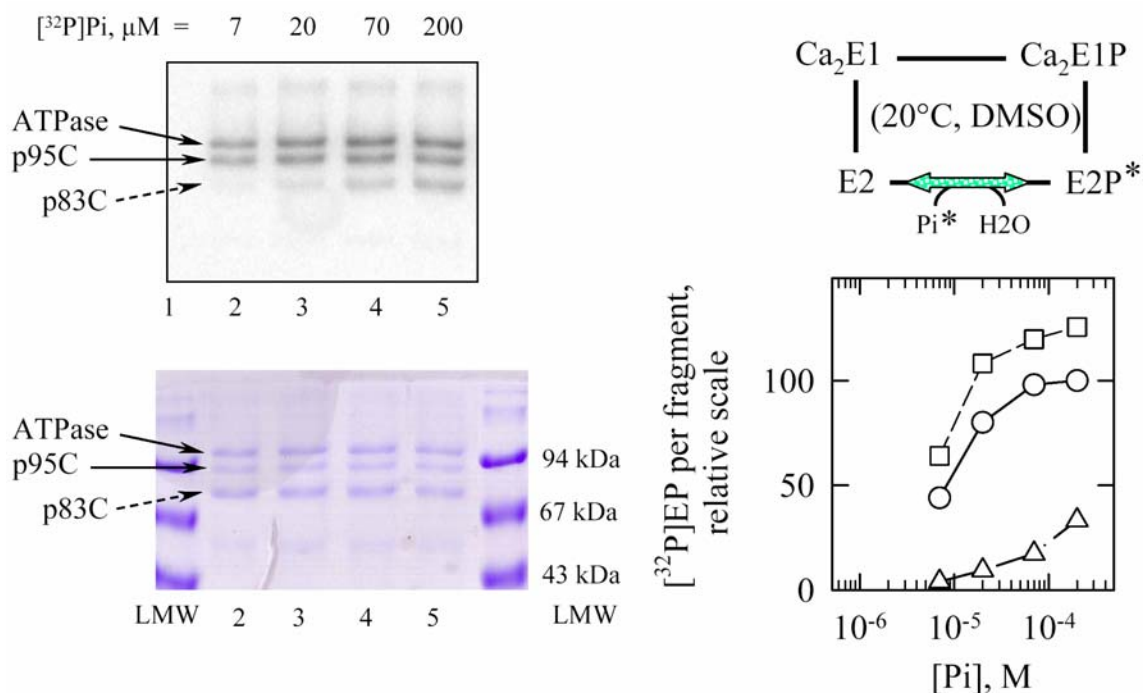


Figure 5. Phosphorylation par le Pi de l'ATPase et de ses fragments p95C et p83C, obtenus après traitement des membranes de SR à la protéinase K (voir aussi première partie du chapitre suivant).

Notons qu'une semblable méthode de mesure de la phosphorylation a également été utilisée pour mesurer la phosphorylation, par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ou par le $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$, d'une ATPase (sauvage ou mutante) *exprimée dans la levure*, purifiée et reconstituée. Les réactions de phosphorylation ont été réalisées comme précédemment, sauf que, dans ce cas, nous avons dû augmenter la radioactivité spécifique du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ et du $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$ (2mCi/ μmol au lieu de 0,5mCi/ μmol) en raison de la faible quantité d'enzyme disponible avec ces préparations d'enzymes exprimées et purifiées. Les mesures au PhosphorImager sont plus sensibles et ont beaucoup moins de «bruit» que les mesures de radioactivité faites sur un compteur à scintillation.

6. Mesures de fluorescence à l'équilibre

Les protéines du réticulum, excitées dans l'ultra violet à des longueurs d'onde de l'ordre de 290 ou 295 nm, émettent de la fluorescence avec un spectre d'émission centré sur 330 nm. Cette fluorescence « intrinsèque » est due en grande partie aux 13 Trp de l'ATPase (12 d'entre eux sont situés dans la partie transmembranaire, un seul est situé dans la partie cytosolique). La fluorescence intrinsèque est un index conformationnel particulièrement souple, qui a donc été fréquemment utilisé depuis les toutes premières mesures (Dupont 1976). En effet, plusieurs des différentes étapes du cycle donnent lieu à des variations de fluorescence relative, variations faibles mais bien reproductibles: transition $\text{E2} \leftrightarrow \text{E1Ca}_2$, fixation de nucléotide, phosphorylation par le Pi ... Nous avons réalisé ces mesures de fluorescence avec un fluorimètre SPEX *fluorolog*, avec pour source excitatrice une lampe Xénon.

Nous avons fréquemment utilisé les propriétés de fluorescence des Trp au cours de notre étude, on le verra plus loin. Nous avons aussi, avec G. Lenoir, adapté cette technique à une étude de mutants purifiés de l'ATPase. Dans ce cas, les signaux sont beaucoup plus délicats à observer, parce que la quantité de matériel est significativement plus faible après expression et purification sur colonne, mais aussi parce que les préparations contiennent une quantité non négligeable de protéines contaminantes. Il est toutefois possible de trouver des conditions adéquates pour l'observation de ces signaux, en maximisant l'amplitude des

signaux et en diminuant au maximum le bruit de fond des traces de fluorescence. On en reparlera dans la deuxième partie du chapitre suivant, mais j'en donnerai déjà ici un premier exemple.

Changements de fluorescence intrinsèque pour une ATPase mutée dans l'un de ses sites Ca^{2+} , ou bien mutée au niveau de l'un de ses résidus Trp.

En guise d'illustration, la Figure 6 montre d'abord (traces du haut) les changements de fluorescence « standards » observés lorsqu'une ATPase sauvage (WT), purifiée et reconstituée en lipides, est d'abord privée de ses ions calcium (préalablement fixés), puis phosphorylée par le Pi , puis finalement déphosphorylée par addition de Ca^{2+} .

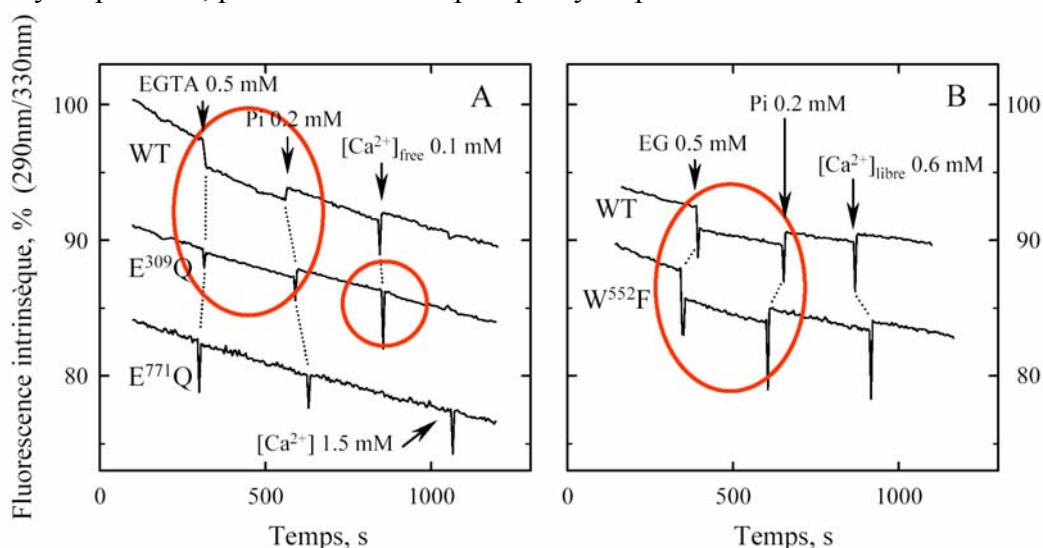


Figure 6. Variations de fluorescence intrinsèque induites par la dissociation du Ca^{2+} ou la phosphorylation par le Pi de différentes ATPases, exprimées dans la levure puis purifiées et reconstituées: ATPase sauvage (WT), mutée sur des résidus impliqués dans la fixation du Ca^{2+} (E309Q, E771Q), ou encore mutée sur le seul résidu Trp situé dans la partie cytosolique de SERCA (W552F) (Lenoir et al., soumis à *Biochemistry*)

Cette Figure montre ensuite (panneau A, trace du milieu) que le mutant purifié E309Q, muté au site « II » de fixation du calcium (et dont on croit qu'il a gardé sa capacité à fixer du calcium au site I avec une affinité presque inchangée), reste capable de subir un changement de fluorescence lorsqu'il est phosphorylé par le Pi en absence de calcium, mais ne subit pas de changement de fluorescence lorsque l'unique calcium qui y était fixé se dissocie (au moment de l'addition d'EGTA). Le mutant E771Q, qui ne montre aucun changement de fluorescence, a été purement et simplement dénaturé pendant sa purification, ce qui souligne la fragilité de SERCA solubilisée lorsque le Ca^{2+} ne peut pas du tout s'y fixer.

Pour sa part, la Figure 6B montre que, dans l'espoir de disposer de sondes spectroscopiques plus sélectives que la collection indistincte des 13 Trp de l'ATPase, on peut envisager de muter un à un ces différents tryptophanes. Dans cette Figure, nous voyons que la disparition du Trp 552 du domaine de fixation du nucléotide (ce résidu a été muté en phénylalanine par Christine Jaxel) n'empêche pas d'observer des signaux de fluorescence semblables à ce que l'on voit pour l'ATPase sauvage. Le Trp 552 ne joue donc aucun rôle dans ces signaux ; il n'affecte d'ailleurs pas non plus l'activité ATPasique de la protéine (données non montrées ici). Ceci ouvre la voie à la préparation d'ATPases ne gardant plus qu'un nombre très réduit de tryptophanes bien choisis pour être sensibles aux événements étudiés.

Il est aussi possible de marquer l'enzyme avec des sondes extrinsèques fluorescentes, par exemple le 5'-isothiocyanate de fluorescéine (FITC), qui se fixe spécifiquement et de

manière covalente au résidu Lys 515 situé dans le domaine cytosolique N (Pick and Karlsh 1980; Mitchinson et al. 1982). On le verra, nous nous en sommes servis notamment pour étudier les événements consécutifs à la dissociation du Ca^{2+} . En excitant l'ATPase- Ca^{2+} marquée au FITC à 490 ou 500 nm (voire 460 nm, dans certains cas), on observe un spectre de fluorescence centré sur 525 nm. Cette fluorescence est elle aussi sensible aux transitions conformationnelles de l'enzyme. Tous les états de l'enzyme ne sont cependant pas accessibles : la fixation de FITC entraîne une perte d'activité enzymatique liée à l'incapacité pour l'ATPase de fixer l'ATP. En revanche, l'enzyme peut toujours être phosphorylée par l'acétylphosphate.

Classiquement, le marquage est réalisé par ajout de quantités quasi-stœchiométriques d'ATPase et de FITC: le protocole le plus couramment utilisé au laboratoire consiste à incuber 2 mg/ml de SR (c'est à dire environ 10-12 μM d'ATPase) avec 16 μM de FITC, dans Tricine-Tris 10 mM, sucrose 0,3 M, Mg^{2+} 1 mM et Ca^{2+} 10 μM à pH 8 et 20°C pendant 30 minutes. L'efficacité du marquage est suivie en prélevant périodiquement une aliquote du milieu de réaction et en la diluant dans un milieu de dosage de l'activité ATPasique, afin de suivre la perte d'activité ATPasique consécutive à la fixation de FITC.

7. Mesure optique d'une réaction sur de courtes échelles de temps, après mélange rapide et flux interrompu (« stopped-flow »)

La technique de *stopped-flow spectroscopy*, littéralement « spectroscopie en flux interrompu », permet de mesurer l'évolution sur des temps courts (typiquement inférieurs à quelques secondes) des propriétés optiques d'un objet coloré ou fluorescent lors de son mélange avec un réactif (le « temps mort » est cependant de quelques millisecondes).

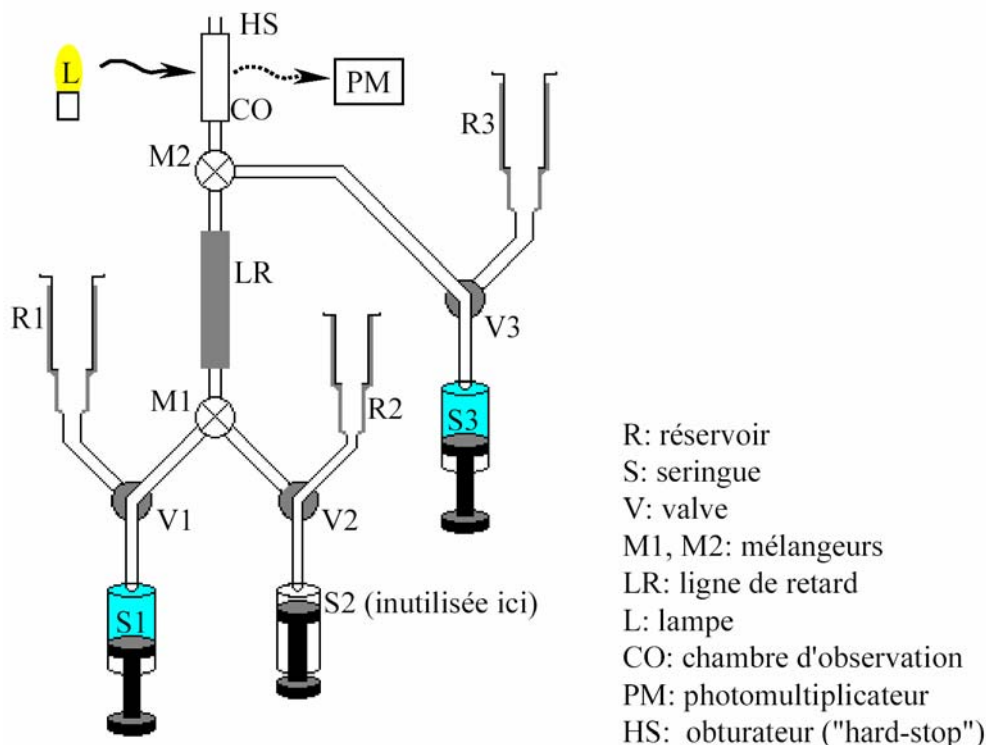


Figure 7. Représentation schématique d'un système de spectroscopie «stopped-flow» à plusieurs seringues

Le mélange est réalisé au moyen de seringues dont les pistons peuvent être actionnés par des moteurs pas à pas. La version la plus simple n'utilise que deux des trois seringues illustrées sur la Figure 7 ci-dessus, par exemple S1 et S3. Quand la réaction est déclenchée, le contenu de ces deux seringues est poussé vers un mélangeur (M2 sur le schéma), et le

mélange formé remplit, au bout de quelques millisecondes à peine, une chambre d'observation qui voit donc passer en continu un mélange « frais » qui n'a que quelques millisecondes d'âge. Si maintenant on arrête ce flux, en stoppant les seringues («stopped-flow») et en déclenchant éventuellement en même temps un obturateur («hard-stop»), le mélange s'immobilise dans la chambre d'observation et commence à y vieillir. La cuvette est éclairée par une lampe au xénon (dopée au mercure), et un système optique permet de recueillir, au choix, ou bien la lumière transmise par le mélange en train de vieillir, ou bien la fluorescence qu'il émet. On peut donc suivre les propriétés optiques du mélange au cours de son vieillissement.

La vitesse à laquelle les pistons poussent le mélange et la distance que ce dernier parcourt dans les conduits entre le mélangeur M2 et la cellule d'observation définissent le temps mort du système, c'est à dire le temps pendant lequel la réaction va évoluer avant que l'on ne puisse la mesurer. Dans nos conditions expérimentales (poussée de 100 µl des seringues 1 et 3 pendant 100 ms), le temps mort est de l'ordre de 3 msec.

Notre appareil de stopped-flow est le SFM3 de Biologic (Claix, France). La fluorescence émise y est détectée par un photomultiplicateur précédé de filtres adéquats, de manière à détecter spécifiquement la fluorescence émise par le fluorophore d'intérêt (ici : tryptophanes, FITC ou quin2 -dont nous parlerons ci-dessous-) tout en éliminant l'énorme signal de diffusion (à la longueur d'onde excitatrice) dû à la turbidité de nos membranes. Pour le FITC ou le quin2, nous avons utilisé des filtres dont la bande passante est centrée à 530 nm (le quin2 a un spectre d'émission centré autour de 500 nm). Pour les Trp, nous avons utilisé la combinaison d'un large filtre passe-bande centré sur 340 nm (A340) et d'un filtre passe-haut (J324) qui élimine toute diffusion à la longueur d'onde excitatrice (290 nm). Ces différents filtres proviennent de MTO (Massy, France). Les signaux obtenus sont analysés au moyen d'un programme de fit (méthode Simplex).

NB : L'amplitude apparente des changements de fluorescence observés au stopped-flow, par exemple lorsqu'on suit la fluorescence des Trp ou du FITC dans une réaction donnée, est en général un peu plus faible que ce que l'on voit (sans pouvoir en résoudre la cinétique) en fluorescence à l'équilibre (par exemple 3 % au lieu de 5 %). Plusieurs interprétations de ce fait peuvent être envisagées. Cet écart peut être dû au fait qu'en stopped-flow, la fluorescence émise est sélectionnée par un filtre seulement et que la réjection de la lumière parasite (diffusion notamment) est moins parfaite que sur un spectrofluorimètre. Il se peut aussi qu'une partie de la réponse en stopped-flow soit tellement rapide qu'elle se passe pendant le temps mort de l'appareil, et que cette partie-là du signal soit perdue.

Différentiation spectroscopique des sous-étapes impliquées dans la dissociation du Ca^{2+} .

En guise de première illustration des possibilités de cette technique de stopped-flow, je montrerai un résultat que j'ai obtenu au début de ma thèse, dans le cadre d'une tentative de résolution des sous-étapes impliquées dans la dissociation des deux ions Ca^{2+} initialement fixés sur l'ATPase. Pour étudier ces sous-étapes, l'idée était de comparer les signaux enregistrés, au cours du même évènement de dissociation du Ca^{2+} , par deux sondes différentes de l'état de l'ATPase : d'une part le FITC dont on a déjà parlé, fixé sur le domaine N, et d'autre part les résidus Trp de l'ATPase, pour la plupart dans le domaine transmembranaire, et dont on peut continuer à observer la fluorescence malgré le marquage de l'ATPase au FITC (ce marquage au FITC n'affecte d'ailleurs pas les propriétés des Trp lors de la fixation du Ca^{2+} ou de sa dissociation). Le résultat de l'expérience est illustré sur la Figure 8, dans deux conditions différentes de pH à 20°C (la concentration de SR après mélange est de 0,2 mg/ml).

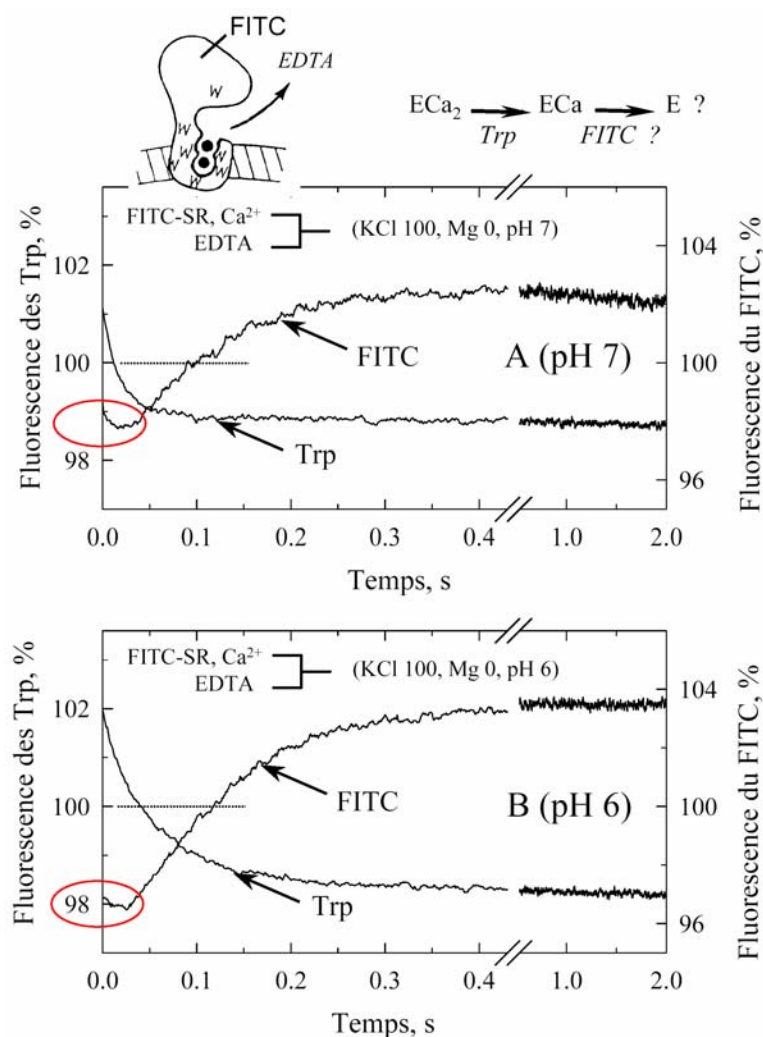
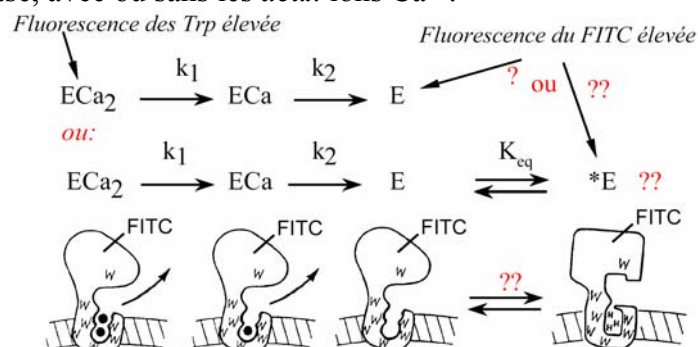


Figure 8. Variations de fluorescence observées, à pH 7 (A) ou pH 6 (B), lors de la dissociation du calcium à (20°C): fluorescence du FITC fixé à Lys515, et fluorescence des résidus Trp de la même ATPase marquée.

Dans les deux cas, on voit que les changements de fluorescence (vers le haut) du FITC ont un retard évident sur les changements de fluorescence (vers le bas) des Trp : la fluorescence des résidus Trp doit commencer à baisser *dès le départ* du premier ion Ca^{2+} , alors que la montée de fluorescence du FITC et un événement *plus tardif* : ou bien il se produit lors de la dissociation du deuxième ion Ca^{2+} , ou bien il se produit lors d'une réorganisation conformationnelle de l'ATPase qui suivrait cette dissociation du deuxième ion Ca^{2+} (cf schéma ci-dessous). Nous n'avons cependant pas encore réussi à conclure de manière sûre dans un sens ou dans l'autre. Des études de ce type sont difficiles mais méritent sans doute d'être poursuivies, la cristallographie ne fournissant à ce jour que l'image des états extrêmes de l'ATPase, avec ou sans les *deux* ions Ca^{2+} .



8. Mesure par fluorescence de la vitesse de dissociation du Ca^{2+} , en présence de « quin2 »

J'ai en particulier (cf chapitres V et VI) utilisé un tel système de stopped-flow pour mesurer la vitesse à laquelle le Ca^{2+} se dissocie d'un complexe préformé (complexe avec une molécule simple, ou bien avec une protéine liant le calcium, comme notre ATPase), en utilisant le quin2 comme sonde fluorescente. Le quin2 est un chélateur fort du calcium qui, par ailleurs, émet de la fluorescence avec un niveau plus élevé lorsqu'il a fixé du calcium que lorsqu'il en est dépourvu. Nous l'excitons à 312 nm (ce n'est pas la longueur d'onde à laquelle le quin2 absorbe le plus, mais cela correspond à une raie du mercure, et cela permet donc d'avoir un signal plus lumineux). Je montrerai sur la Figure 9 ci-dessous l'expérience contrôle qui nous permet de valider la mesure et de la calibrer.

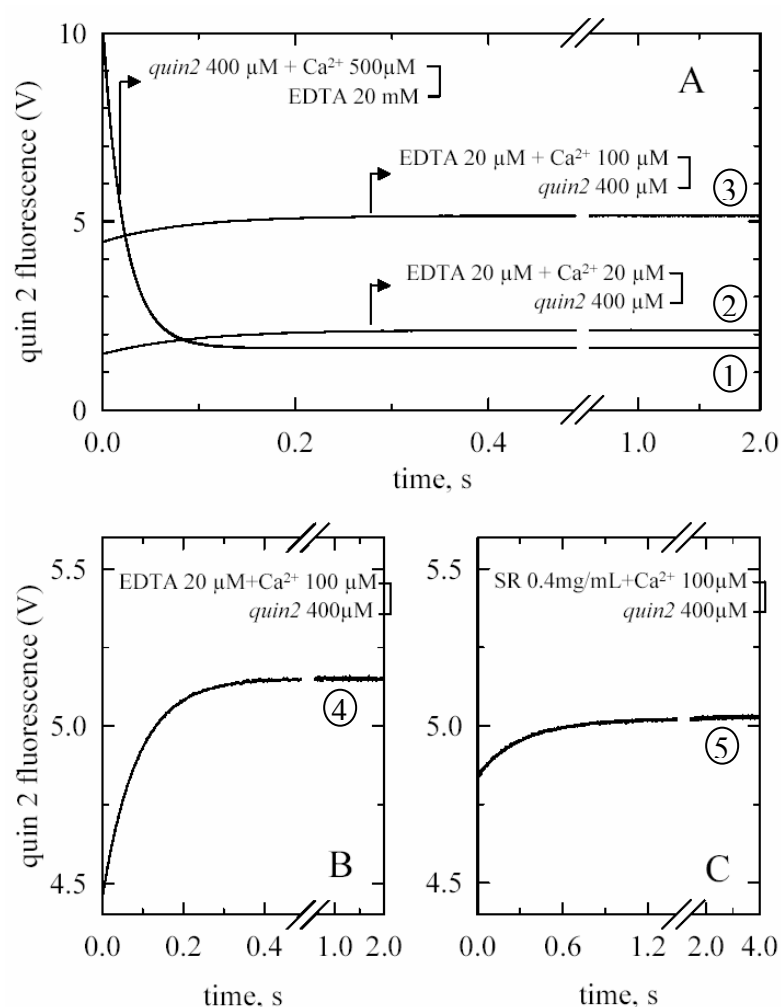


Figure 9. Contrôles classiques de stopped-flow:
dissociation d'un complexe Ca^{2+} . quin2 par mélange avec de l'EDTA en excès (A, trace 1), ou bien dissociation d'un complexe Ca^{2+} . EDTA par mélange avec du quin2 en excès (A, traces 2 et 3, et B, trace 4), ou encore dissociation d'un complexe Ca^{2+} . SERCA1a par mélange avec du quin2 en excès (C, trace 5).
(Mes Tris 50 mM, pH 6, KCl 100 mM, 20°C)

La sensibilité au calcium de la fluorescence du quin2 permet d'abord de suivre la vitesse de dissociation du complexe quin2. Ca^{2+} , quand on le mélange avec un gros excès d'un

autre chélateur du Ca^{2+} , non fluorescent, lui. Ceci est montré sur la Figure 9A ci-dessous par la trace descendante ①. Ici, on a mélangé (volume à volume) 400 μM de complexe quin2. Ca^{2+} avec 20 mM d'EDTA. La fluorescence observée chute à une vitesse qui traduit la vitesse de dissociation du complexe.

Inversement on peut mesurer la variation de fluorescence due à la dissociation, en présence d'un excès de quin2, d'une quantité connue d'un complexe calcium/chélateur non fluorescent. Dans l'expérience présentée panneau A, trace ②, nous avons pré-incubé 20 μM de calcium et 20 μM d'EDTA, puis mélangé au temps zéro avec 400 μM de quin2. Lorsqu'on réalise ensuite une expérience analogue, mais en ayant ajouté maintenant 100 μM de Ca^{2+} aux 20 μM d'EDTA, (panneau A, trace ③), on observe que la cinétique de changement de fluorescence du quin2 est la même que précédemment et que les intensités de fluorescence sont simplement décalées vers de plus fortes fluorescences. Cette expérience nous permet de démontrer (ou de vérifier) que les variations de fluorescence du quin2 reflètent uniquement la dissociation de Ca^{2+} du complexe, et non une éventuelle cinétique de fixation de Ca^{2+} sur le quin2 : celle-ci est déjà terminée après le temps mort de l'appareil.

Cette expérience permet aussi de calibrer les signaux observés, puisque *l'amplitude* du signal correspond à la quantité de Ca^{2+} dissocié. Ainsi, l'amplitude du signal de fluorescence représenté panneau A, trace ③ (que nous avons agrandi dans le panneau B, trace ④) correspond à la dissociation de 20 μM de Ca^{2+} .

Dans l'expérience illustrée sur le panneau C, trace ⑤, c'est le signal lié à la dissociation du Ca^{2+} à partir du complexe formé par SERCA1a avec le calcium qui a été mesuré. Dans cette expérience, nous avons préincubé 0,4 mg/ml de SR et 100 μM de calcium, puis, au temps zéro, mélangé le tout avec un excès de quin2. Si la concentration de sites de fixation du calcium dans les vésicules est bien de l'ordre de 10 à 12,5 nmol/mg de protéine, comme on croit le savoir (Orlowski and Champeil 1991), on doit s'attendre à ce que 4 à 5 μM de calcium soient initialement fixés à l'enzyme. L'amplitude de ce signal de fluorescence correspond bien à la dissociation d'une quantité de calcium 4 à 5 fois plus faible que dans l'expérience « contrôle » de dissociation à partir du complexe Ca^{2+} .EDTA. Sa cinétique révèle la vitesse de dissociation du Ca^{2+} précédemment fixé à l'ATPase. Comme on le verra bientôt, nous avons utilisé cette méthode de mesure à plusieurs occasions au cours de cette thèse.

9. Transport ou fixation non covalente de ligand, mesurés par filtration manuelle

Les mesures par filtration reposent sur la capacité qu'ont les vésicules de SR à *s'adsorber* sur des filtres de nitrocellulose et, immobilisées de la sorte, à conserver leur propriétés fonctionnelles. Le transport actif de calcium et la fixation non covalente de ligands sur l'ATPase peuvent notamment être étudiés avec cette technique. Plusieurs variantes peuvent être utilisées. Dans l'une d'entre elles, nous incubons nos vésicules dans un milieu donné, ajoutons le ligand radiomarké d'intérêt ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, $^{32}\text{P}\text{Pi}$ ou $^{45}\text{Ca}^{2+}$, par exemple) puis, après un certain temps d'incubation, nous déposons ce milieu réactionnel sur un filtre. Dans l'autre, après avoir été préincubées dans les conditions choisies, les vésicules sont déposées sur un filtre puis sont *perfusées* avec un milieu contenant le ligand radiomarké souhaité.

Pour ces deux techniques, la quantité de ligand que l'enzyme a bien voulu fixer est estimée en soustrayant de la radioactivité totale comptée sur le filtre la quantité de radioactivité contenue dans le volume de fluide qui « mouille » le filtre (indépendamment de toute fixation sur les membranes de SR). L'évaluation de cette quantité de radioactivité « mouillante » est possible car nous prenons soin d'ajouter du glucose tritié dans le milieu contenant le ligand à mesurer ($^{45}\text{Ca}^{2+}$ ou $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ par exemple), et de faire un « double comptage » du filtre pour en déduire les quantités des deux isotopes.

On peut vérifier aisément que la quantité de radioactivité ($^{45}\text{Ca}^{2+}$ ou $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, par exemple) retenue sur des membranes de SR adsorbées sur un filtre augmente linéairement avec la quantité de membrane adsorbée, jusqu'à une valeur critique (de 0,3 à 0,4 mg de SR pour un filtre HA, par exemple) correspondant à la situation où les vésicules tapissent l'intégralité de la surface des « pores » du filtre. Différents types de filtres sont disponibles, et selon leur porosité, ils permettent de déposer des quantités plus ou moins élevées de membrane. Classiquement, 0,3 mg de vésicules sont déposées sur les filtres de type HA (pores de $0,45\text{ }\mu\text{m}$) alors que l'on peut déposer 0,6 mg sur les filtres de type GS (pores de $0,22\text{ }\mu\text{m}$).

La filtration manuelle permet l'étude de réactions à l'équilibre, ou de réactions à la cinétique relativement lente. Lorsqu'on veut résoudre des temps inférieurs à la seconde par filtration, une approche un peu plus sophistiquée est possible, la *filtration rapide*, dont nous détaillerons le principe plus loin.

Si par exemple on veut mesurer une fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sur l'ATPase, on dépose d'abord sur le filtre (par exemple HA) la quantité de membranes souhaitée (par exemple 1 ml à 0,3 mg/ml dans le milieu classique Mops-Tris 50 mM, KCl 100 mM, Mg^{2+} 5 mM, pH 7 et 20°C) ; on effectue ensuite si nécessaire un court (1 ml) rinçage préliminaire avec de l'EGTA à faible concentration (par exemple 20 μM , simplement pour chélater le Ca^{2+} contaminant) ; puis on perfuse les vésicules avec la solution de fixation, contenant $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et ^3H , et on le compte directement, sans rinçage. Lorsque le filtre est compté sans rinçage, il faut s'attendre à ce que le signal soit du même ordre de grandeur que le bruit de fond dû au « mouillant », surtout si on étudie une fixation de Ca^{2+} à faible affinité, ou encore un transport par une basse concentration d'enzyme. Les fixations non spécifique (par exemple du Ca^{2+} au niveau de phospholipides négatifs) sont aussi à envisager. Le rapport signal sur bruit est plus élevé à concentration totale de ligand la plus basse possible (dans le cas du Ca^{2+} , celle-ci sera de toute façon limitée par la présence de Ca^{2+} contaminant), et il faut alors prendre une radioactivité spécifique adaptée. L'aspiration sous le filtre et le volume de perfusion sont choisis de manière à ce que le filtre soit rincé pendant une durée assez longue pour que la réaction soit complète.

Si on veut mesurer le *transport* de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ à l'intérieur des vésicules, en présence d'ATP par exemple, il suffit d'ajouter l'ATP au milieu de perfusion. En absence d'ATP, la radioactivité détectée (en excès du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mouillant) correspond à la quantité de calcium fixée sur les vésicules ; en présence d'ATP, s'y ajoute la quantité de calcium transportée de l'extérieur vers l'intérieur de la vésicule. En ce dernier cas, on peut éventuellement rincer avec le filtre avec 1 ml d'EGTA 1 mM, pour se débarrasser de l'essentiel du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mouillant ou fixé à l'extérieur des vésicules.

10. Filtration rapide

La technique de filtration rapide consiste à perfuser un filtre de nitrocellulose (et le matériel biologique qui y est adsorbé) avec une solution de composition voulue pendant des temps courts (mais plus longs que 20-30 ms tout de même), de manière reproductible. Son schéma de principe est illustré sur la Figure 10 ci-dessous.

Le filtre de nitrocellulose est déposé sur un support ① communiquant avec une pompe à vide ②. Le liquide de perfusion est disposé dans une seringue ③ dont le piston est mû par un moteur pas à pas ④. La réaction est déclenchée par le biais d'un contrôleur électronique ⑤ qui déclenche de façon coordonnée la montée du support du filtre vers la base du réservoir (sous l'impulsion d'un électro-aimant ⑥) et la poussée du piston vers le bas. Le liquide perfuse le filtre pendant le laps de temps choisi, au bout duquel le moteur pas à pas et l'électro-aimant s'arrêtent de manière à ce que le support du filtre reprenne sa position initiale.

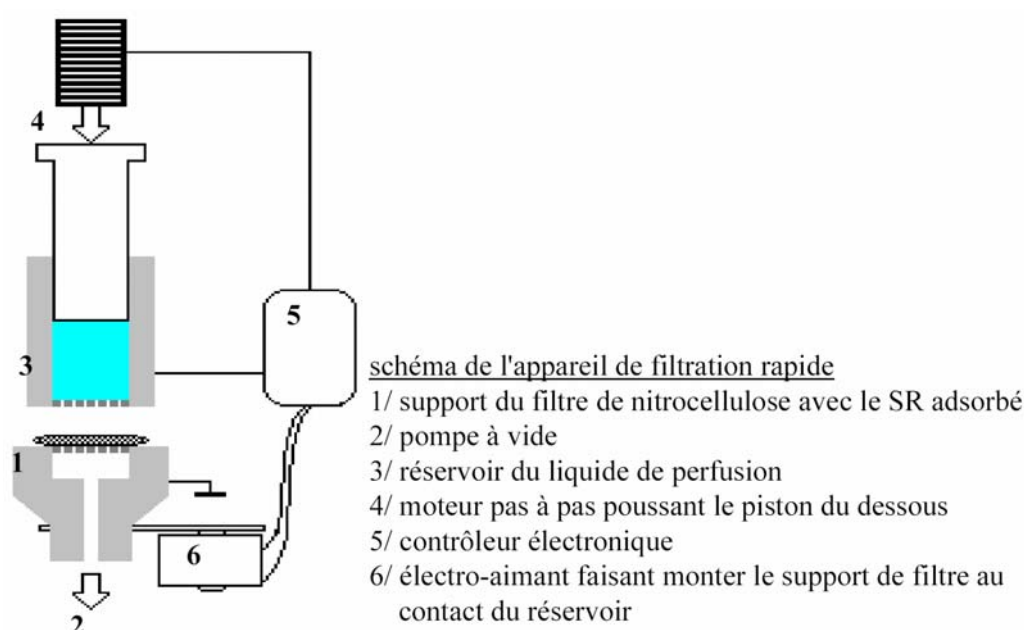


Figure 10. Représentation schématique d'un appareil de filtration rapide (Biologic)

Pour des temps de perfusion relativement longs, on diminue le débit avec lequel le liquide rince le filtre de manière à ce que (pour des raisons de commodité) le volume utilisé ne soit pas trop important. La dépression sous le filtre est alors réduite, pour que l'aspiration ne soit pas trop forte par rapport au débit de perfusion, de manière à ce que le filtre soit rincé uniformément. En effet, si l'aspiration par la pompe est trop forte par rapport au débit de perfusion, le liquide perfusé ne « visite » pas la totalité des pores du filtre, mais passe par les voies de moindre résistance hydrodynamique. A l'inverse, pour les temps courts avec un vide fort, l'aspiration ne doit pas être trop faible, sinon (i) le liquide de perfusion s'échapperait sur le côté et (ii) lors de l'arrêt du piston, cela pourrait induire une surestimation de la durée effective de perfusion, révélée par le contrôleur électronique (qui mesure la durée du contact électrique entre le pourtour métallique du support du filtre et la base du réservoir) : si l'aspiration par la pompe est faible par rapport au débit de perfusion, une colonne d'eau, qui permet le passage du courant, se forme transitoirement quand les parties métalliques se désolidarisent.

Exemple : vitesse de dissociation du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ initialement lié à l'ATPase. Comparaison avec la mesure au stopped-flow en présence de quin2.

L'expérience illustrée sur la Figure 11 ci-dessous, réalisée à l'occasion d'un passage de Johannes Clausen dans notre laboratoire, compare de telles expériences de filtration rapide aux expériences de fluorescence dont il a été question un peu plus haut.

Ici, on a équilibré des vésicules en présence de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, puis on a perfusé le filtre (et les vésicules adsorbées) avec une solution contenant ou bien une concentration de Ca^{2+} libre très basse, environ 40 nM (symboles ronds), ou bien des concentrations plus élevées de Ca^{2+} libre, 100 μM ou 1 mM (triangles et carrés, respectivement).

Dans les deux derniers cas, l'un des deux ions $^{45}\text{Ca}^{2+}$ se dissocie rapidement (dans un schéma où les sites sont disposés en file indienne, ce sera l'ion «superficiel», le plus proche de la sortie, fixé sans doute au site II de l'ATPase), mais le deuxième ion reste plus ou moins bloqué (dans un schéma où les sites sont disposés en file indienne, ce blocage est réalisé par un ion $^{40}\text{Ca}^{2+}$ venu du milieu de perfusion, et qui a remplacé le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ au site superficiel : ce sont en fait des expériences d'échange $^{45}\text{Ca}^{2+}/^{40}\text{Ca}^{2+}$). Par contre, si la concentration de $^{40}\text{Ca}^{2+}$ dans le milieu de perfusion est basse, les deux ions peuvent se dissocier sans encombre, avec une constante de vitesse environ moitié de la constante de vitesse à laquelle s'échappe l'ion superficiel. Un enregistrement en présence de quin2 (cf l'un des paragraphes précédents) de la vitesse de dissociation des ions Ca^{2+} dans les mêmes conditions donne exactement la même cinétique de dissociation (trace continue sur la Figure 11).

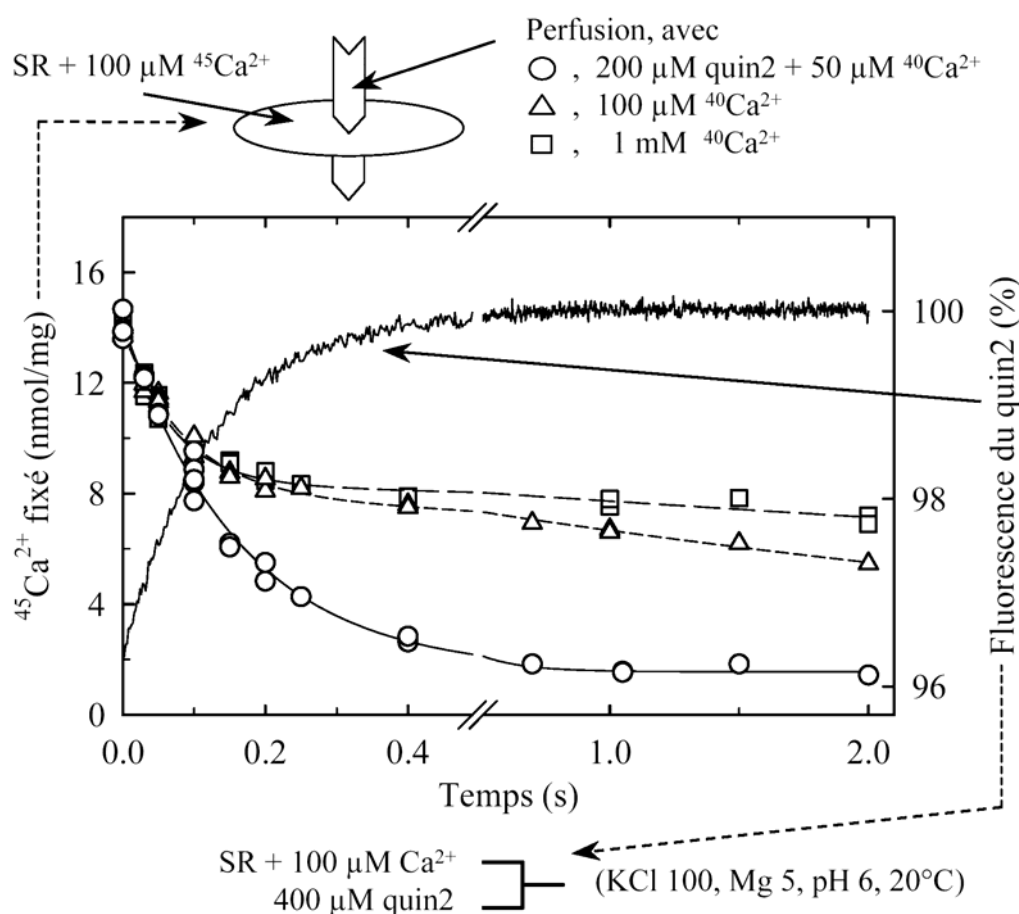


Figure 11. Dissociation (ou échange) du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ évaluée par filtration rapide; comparaison avec une mesure par fluorescence de cette dissociation.

11. Mesure chimique d'une réaction sur de courtes échelles de temps, après mélange rapide et arrêt rapide de la réaction (« quench flow »)

La méthode de « quench flow » est une méthode de choix pour l'étude de cinétiques pré-stationnaires en absence de signal optique. Cette technique permet en effet également de suivre l'évolution de réactions sur des temps courts (mais supérieurs tout de même à quelques millisecondes). Elle a pour principe de mélanger deux solutions, de les laisser évoluer pendant un temps bien défini dans un capillaire de longueur donnée (appelé ligne de retard), et de les faire entrer en contact ensuite avec une troisième solution qui, grâce à la turbulence des flux à l'intérieur du mélangeur, arrête la réaction (« quench flow »). Le tout est récupéré, puis dosé chimiquement, d'une façon ou d'une autre.

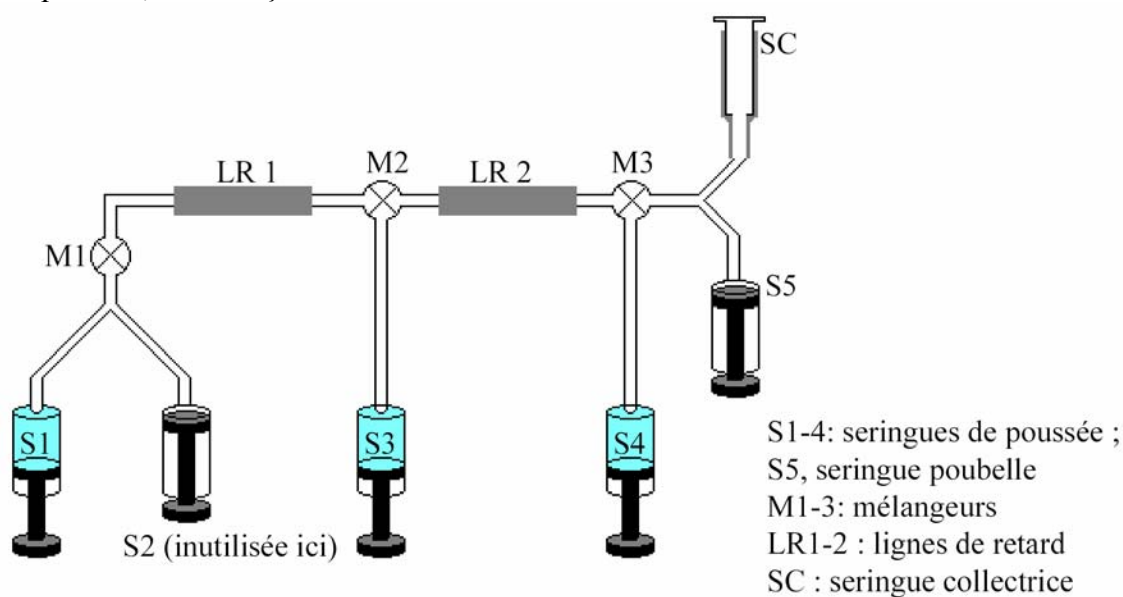


Figure 12. Représentation schématique d'un système de «quench flow» . Voir texte.

Dans le cas simple illustré sur la Figure 12, la seringue S2 est inactive: les contenus de S1 et S3 (*i.e.* les solutions devant réagir) sont mélangés dans M2, et au cours d'une poussée continue vieillissent dans LR2 avant mélange en M3 avec la solution d'arrêt contenue dans S4. Dans le cas plus compliqué de mélanges successifs, la poussée de S1 et S2 mélange leurs contenus en M1, ce mélange évolue dans LR1 pendant un temps défini avant d'entrer en contact avec le contenu de S3. Le mélange des trois réactifs parcourt alors une deuxième ligne de retard, LR2. Enfin la réaction est arrêtée en M3 par la solution d'arrêt contenue dans S4. Dans tous les cas le produit de la réaction est finalement récolté dans la seringue SC, dite de collecte, dans le but d'être analysé, *après* que l'on se soit débarrassé dans une seringue « poubelle » (S5) du volume de mélange correspondant aux fluides qui étaient restés dans les lignes de retard depuis le tir précédent. Ce système est particulièrement adapté à des mesures de dosage de radioactivité, bien que la gestion des différents temps de poussée (poussée pour la poubelle, poussée pour la collecte) soit un vrai casse-tête. Nous avons utilisé cette technique principalement pour des mesures de formation de dérivé phosphorylé, que ce soit à partir de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ou de $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$. Je donnerai ci-dessous une illustration d'une mesure un peu plus sophistiquée : la mesure de la vitesse, lors de la dissociation du Ca^{2+} à pH 6, à laquelle l'ATPase cesse d'être phosphorylable par l'ATP.

Mesure de la vitesse à laquelle, lors de la dissociation du Ca^{2+} , l'ATPase cesse d'être phosphorylable par l'ATP.

Ici, toujours avec J. Clausen à l'occasion de son passage dans notre laboratoire, nous avons reproduit une expérience relativement classique : à différents temps après le début de la dissociation du Ca^{2+} (déclenchée par l'addition de quin2 à du SR préincubé en présence de Ca^{2+}), on ajoute, dans un appareil de QFM, du $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($5\text{ }\mu\text{M}$ final), que l'on laisse réagir pendant 35 ms avant que la réaction de phosphorylation ne soit arrêtée à l'acide. Le dérivé phosphorylé formé est dosé par filtration après plusieurs rinçages. La logique de ces expériences (Rauch et al. 1978; Sumida et al. 1978; Petithory and Jencks 1988) veut que pendant cette courte période de 35 ms, c'est seulement la forme E1Ca_2 qui aura pu réagir avec l'ATP et former du dérivé phosphorylé. On va donc, selon cette logique, doser la disparition au cours du temps de la forme E1Ca_2 . De fait, la «phosphorabilité» de l'ATPase chute relativement rapidement après mélange avec le chélateur du Ca^{2+} (Figure 13).

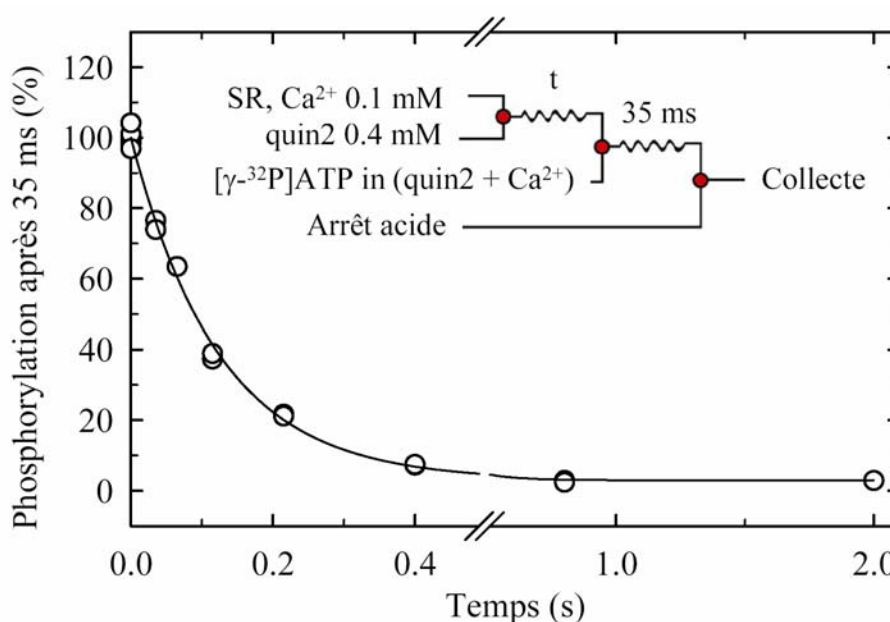


Figure 13. Disparition au cours du temps de la capacité de l'ATPase à être phosphorylée par l'ATP, lors de la dissociation des ions Ca^{2+} . Expérience de «quench flow», dans des conditions identiques à celles de la Figure 11.

Ce qui n'est pas classique, c'est d'avoir réalisé cette expérience dans des conditions nous permettant de mesurer en parallèle la dissociation effective des deux ions Ca^{2+} (les conditions de la Figure 13 sont en effet rigoureusement identiques à celles de la Figure 11, où cette dissociation du Ca^{2+} a été suivie de deux façons différentes). Et contrairement à ce qui était attendu au nom de la logique rappelée ci-dessus, la perte de la capacité à se phosphoryler suit la *même* cinétique que la dissociation *globale* des *deux* ions Ca^{2+} , et pas la cinétique (plus rapide) de dissociation du seul ion superficiel. Nous essaierons plus tard de comprendre ce résultat ...

Chapitre IV: premiers travaux.

Etudes fonctionnelles d'enzymes modifiées

1. ATPase protéolysée : propriétés fonctionnelles de SERCA après clivage au site Leu119-Lys120, près du domaine A (Manuscrit # 1)

2. ATPase mutée : rôle de la « boucle L6-7 » dans l'activation de l'ATPase- Ca^{2+} par le Ca^{2+} et l'ATP (Manuscrit # 2)

3. Manuscrit # 1:

Functional properties of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase after proteolytic cleavage at Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰, close to the A-domain.

Lenoir, G., Picard, M., Gauron, C., Montigny, C., Le Maréchal, P., Falson, P., le Maire, M., Møller, J.V., and Champeil, P. (2004)
J. Biol. Chem. 279, 9156-9166.

4. Manuscrit # 2:

Involvement of the L6-7 loop in SERCA1a Ca^{2+} -ATPase activation by Ca^{2+} (or Sr^{2+}) and ATP.

Lenoir, G., Picard, M., Møller, J.V., le Maire, M., Champeil, P., and Falson, P. (2004)
J. Biol. Chem. 279, 32125-32133.

Chapitre IV: premiers travaux.

Etudes fonctionnelles d'enzymes modifiées

Les outils évoqués au chapitre précédent nous ont d'abord permis de caractériser certaines des perturbations fonctionnelles résultant de telle ou telle modification de l'ATPase. De ces travaux, menés en collaboration avec Guillaume Lenoir qui terminait sa thèse au laboratoire quand j'y suis arrivé, je ne décrirai que ce pour quoi ma contribution aura été, je l'espère, significative. Nous avons étudié d'une part une ATPase modifiée par coupure protéolytique (Lenoir et al. 2004a), d'autre part un mutant de SERCA1a exprimé dans la levure et purifié (Lenoir et al. 2004b).

1. ATPase protéolysée : propriétés fonctionnelles de SERCA après clivage au site Leu119-Lys120, près du domaine A (Manuscrit # 1)

La capacité qu'ont les protéases (protéinase K, protéinase V8, trypsine ...) à cliver différemment l'ATPase sous l'une ou l'autre de ses différentes conformations a fait l'objet de nombreuses études (Juul et al. 1995; Champeil et al. 1998; Danko et al. 2001a; Danko et al. 2001b; Møller et al. 2002) ; on en a vu aussi un exemple dans Matériel et Méthodes, et on en verra une illustration supplémentaire dans le chapitre V un peu plus loin. Par exemple, il a été montré qu'en présence de Ca^{2+} , la protéinase K clive l'ATPase de manière préférentielle dans la boucle reliant le domaine A au segment transmembranaire M3, et plus précisément au niveau de la liaison peptidique entre les résidus Thr242 et Glu243 (voir Figure 1, puits 2-5 et schémas au-dessous). Les deux fragments ainsi obtenus, nommés p83C et p28N en raison de leurs tailles, restent associés (même en détergent) et ont pu être obtenus en quantités relativement importantes (de l'ordre du milligramme), ce qui a permis de mener à bien avec des méthodes traditionnelles toute une série d'études fonctionnelles (mesures de l'activité ATPasique, phosphorylation par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, par le $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$, transport et fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$). Le résultat en est décrit dans un papier de 2002 (Møller et al. 2002): l'ATPase ainsi clivée peut être phosphorylée par l'ATP mais ne transporte pas le $^{45}\text{Ca}^{2+}$, et l'étude détaillée de l'effet de ce clivage sur le cycle catalytique révèle l'incapacité pour l'ATPase à former l'intermédiaire E2P, forme phosphorylée insensible à l'ADP. Ceci suggérait déjà l'importance du positionnement adéquat du domaine A pour que l'ATPase fonctionne correctement (Møller et al. 2002).

En absence de Ca^{2+} (en présence d'EGTA), par contre, la protéinase K clive l'ATPase en un point supplémentaire, ce qui aboutit à la formation de fragments de différentes tailles dont aucun n'est majoritaire. Les fragments p83C et p28N s'accumulent moins, au bénéfice de deux nouveaux fragments, de 95 kDa et 14 kDa respectivement. Il a été montré que ces derniers fragments résultent de la coupure entre deux résidus situés dans une deuxième boucle reliant le domaine A et la membrane, plus précisément le segment transmembranaire M2: entre la Leu119 et la Lys120 (Juul et al. 1995).

La Figure 1 ci-dessous montre un gel mettant en évidence les produits de la protéolyse au cours du temps, en présence ou en absence de Ca^{2+} . Les fragments qui nous intéressent sont entourés et identifiés (« ATPase », « p95C », « p14N », « p83C » et « p28N »). D'autres bandes sont visibles, mais les bandes de peptides migrant avec des masses moléculaires comprises entre 43 et 67 kDa correspondent à deux protéines également présentes, avec l'ATPase, dans nos préparations de SR : la protéine M55 et la calséquestrine. Les bandes de plus petites masses moléculaires apparaissant au cours du temps correspondent à des

fragments de digestion résultant de coupures secondaires. Les différents fragments obtenus après coupure par la protéinase K sont schématisés en bas de la Figure 1.

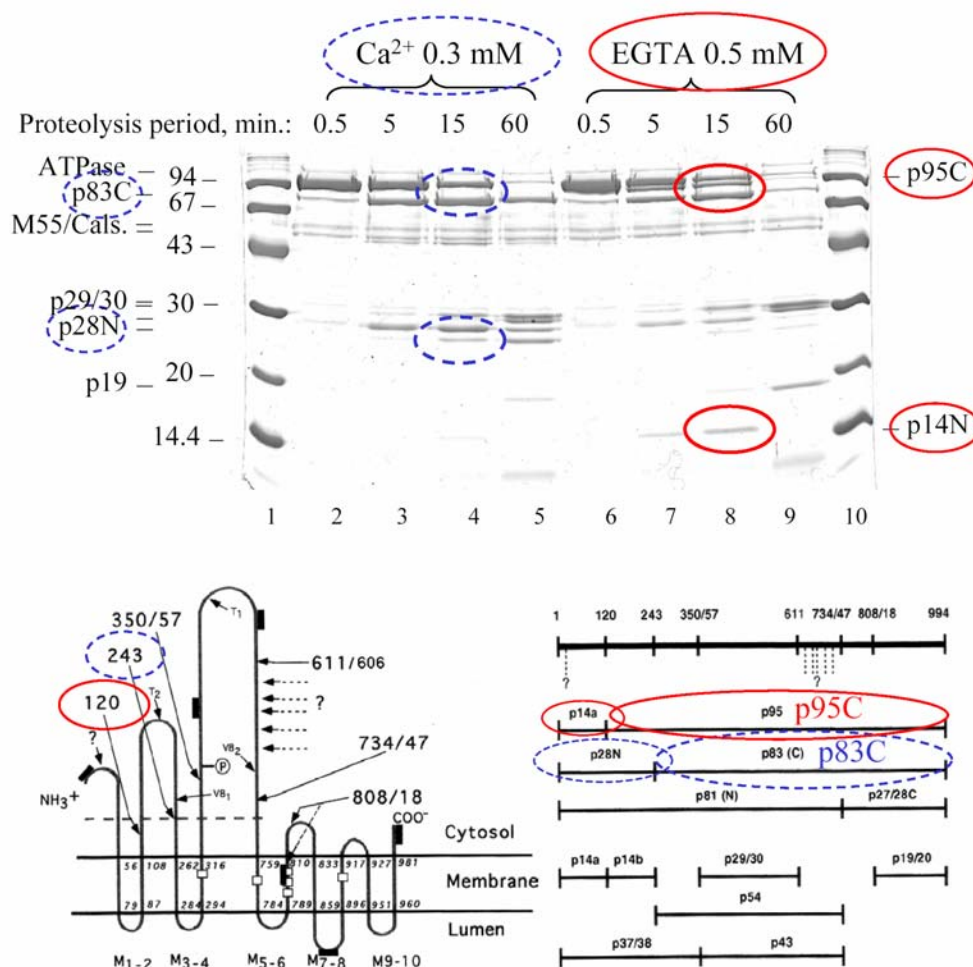


Figure 1. Séparation électrophorétique sur gel d'acrylamide des différents fragments obtenus après protéolyse ménagée à la protéinase K, en présence ou en absence de Ca²⁺. Représentation schématique des différents sites de clivage et des différents fragments peptidiques obtenus après coupure.

Tout comme la coupure protéolytique donnant naissance au complexe « p83C/p28N », la coupure protéolytique donnant naissance au complexe « p95C/p14N » est susceptible d'affecter le positionnement du domaine A, dont le rôle n'était pas bien compris au moment de ces expériences. Nous avons voulu étudier les propriétés fonctionnelles de ce deuxième complexe, pour tenter de préciser pourquoi le domaine A est si important pour le fonctionnement de l'ATPase. Mais, comme décrit ci-dessus, la protéolyse conduit à de nombreux produits de clivage, et il n'est pas possible d'isoler le complexe « p95C/p14N » seul, qui se forme en relativement faible quantité par rapport à « p83C/p28N » ou à l'ATPase native.

Nous avons donc mis en place un protocole permettant de soumettre les membranes de SR protéolysées aux expériences de phosphorylation ou de déphosphorylation désirées, et de séparer *seulement ensuite* les différents fragments, pour étudier leur phosphorylation, en adoptant un protocole de séparation électrophorétique minimisant la déphosphorylation au cours de la migration tout en restant suffisamment résolutif (Sarkadi et al. 1986). Cette méthode est remarquable car elle permet de caractériser *simultanément* les propriétés

fonctionnelles de l'ATPase intacte (contrôle) et de différents produits de coupure, mêmes minoritaires. De plus, elle s'adapte à différents protocoles de phosphorylation, y compris aux protocoles de cinétiques préstationnaires qui nous intéressent particulièrement dans le cadre de cette thèse. Je résumerai brièvement certains des résultats de cette étude (voir la publication originale, insérée suite à ce chapitre, pour plus amples détails).

Nous avons utilisé la technique de « quench flow » pour mesurer à température ambiante, sur des temps courts, la cinétique de phosphorylation de l'ATPase et de ses fragments par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Les mesures ont été réalisées dans le tampon Mops-Tris 50 mM, KCl 100 mM, Mg^{2+} 5 mM à pH 7 et 20°C. On préincube 0,4 mg/ml de protéine clivée à la protéinase K avec 150 μM de Ca^{2+} et 100 μM d'EGTA. Ce mélange est placé dans la seringue N°1 du QFM (voir chapitre III) ; il sera mélangé volume à volume avec une solution de 10 μM de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (de radioactivité spécifique 0,5 mCi/ μmol), contenue dans la seringue N°3 (la seringue N°2 n'est pas utilisée dans ce protocole). On laisse évoluer la réaction de phosphorylation pendant des temps croissants en augmentant la longueur (le volume) de la ligne de retard LR 2. La réaction de phosphorylation est arrêtée par une solution acide TCA 1,5N/ NaH_2PO_4 90 mM contenue dans la seringue N°4 et mélangée aux deux solutions précédentes dans le rapport 1/1/1. Pour chaque temps de réaction, on récupère 900 μl , desquels 750 μl sont mis à centrifuger puis resuspendus suivant le protocole décrit dans le chapitre III, pour être enfin déposés sur gel d'électrophorèse de type Sarkadi, séparés, et comptés au PhosphorImager.

Le panneau A de la Figure 2 montre les niveaux de phosphorylation atteints par chacun des fragments issus de la protéolyse. Nous n'avons représenté que la partie du gel correspondant à la migration de l'ATPase non clivée (« ATPase ») et de ses plus gros fragments, issus de la coupure L119-K120 (« p95C ») ou de la coupure en Thr242-Glu243 (« p83C »). Le panneau C correspond à ces mêmes fragments mais il s'agit ici du gel coloré au bleu de Coomassie lui-même. A partir de ce gel, nous avons déterminé la quantité de protéine déposée pour chacun des puits. Ceci nous a permis de rapporter le niveau de phosphorylation à la quantité (en moles) de fragment formé pour chacun des fragments protéolytiques. Ce rapport n'est que modérément plus faible que ce que l'on attend : on a déposé 20 μl de protéine à 0,4 mg/ml sur le gel, *i.e.* 8 μg , dont environ 1-2 μg d'ATPase résiduelle, et la quantité de radioactivité due au $[\text{}^{32}\text{P}]$ associé au fragment intact de l'ATPase à l'état stationnaire est de l'ordre de 2 pmol, ce qui fait 1-2 nmol/mg de dérivé phosphorylé après SDS-PAGE ; comme on estime la phosphorylation initiale de l'ATPase, avant SDS-PAGE, à 4 nmol de EP par mg de protéine, le protocole de migration électrophorétique choisi n'a donc pas fait perdre trop de dérivé phosphorylé. Les niveaux de phosphorylation ont été normalisés en prenant le niveau de phosphorylation maximal de l'ATPase intacte (après 200 msec) comme 100 % (panneau B). Notons qu'en absence de Ca^{2+} (piste N°2), aucune phosphorylation n'a lieu, comme attendu.

Nous observons, grâce à cette technique, que la vitesse initiale de phosphorylation par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ n'est que modérément ralentie pour le fragment clivé en Leu119-Lys120, par rapport à l'ATPase native ou à l'ATPase clivée en Thr242-Glu243. Et les niveaux de phosphorylation atteints sont identiques.

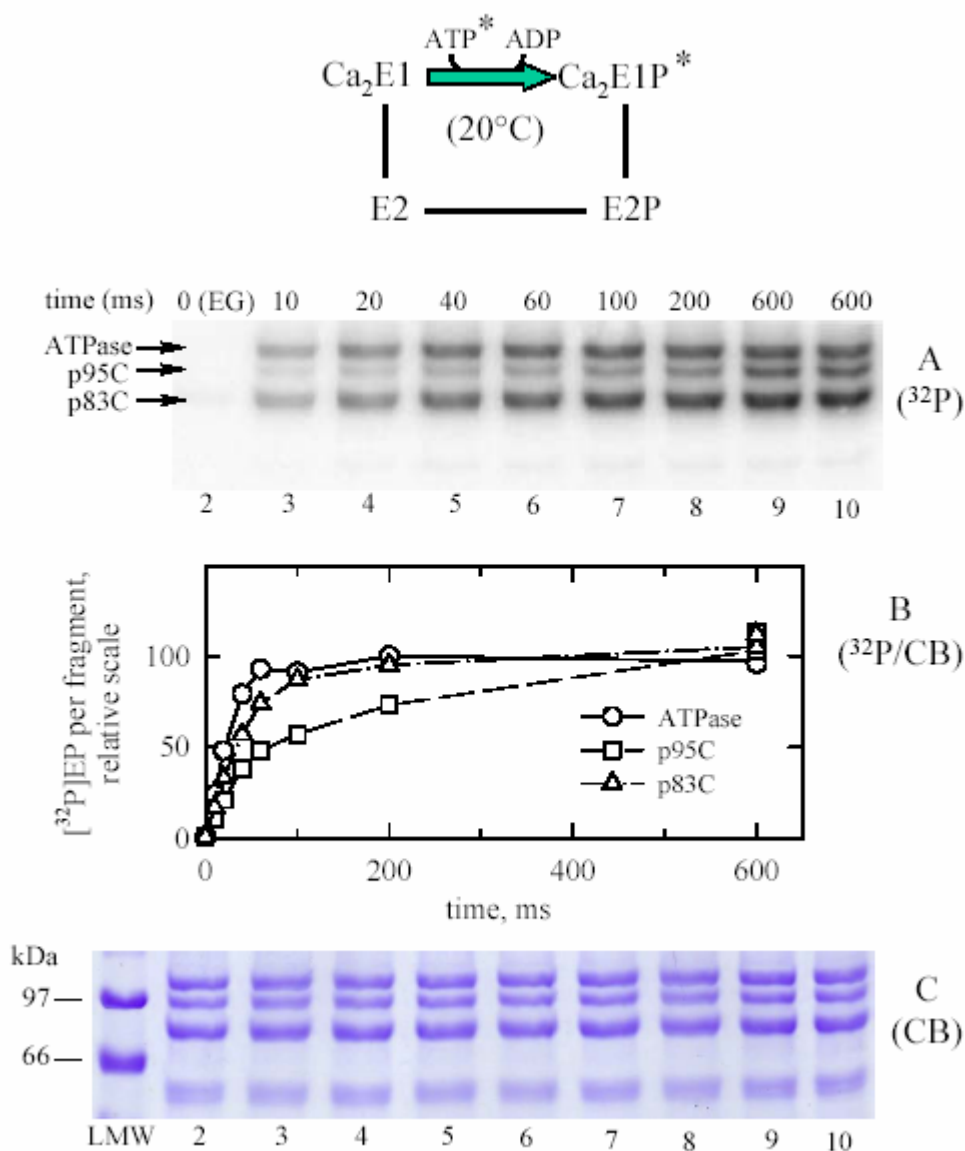


Figure 2. Cinétiques de phosphorylation de l'ATPase et de ses fragments par 5 μM de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, mesurées à température ambiante en « quench flow »

D'autres expériences ont alors été réalisées, à 4°C cette fois, de manière, après avoir atteint l'état stationnaire, à pouvoir mesurer la vitesse de *déphosphorylation* des différents fragments (Figure 3). Sur l'échelle de quelques secondes à 4°C, le ralentissement de la phosphorylation observé pour le fragment p95C n'est plus visible. En revanche, la déphosphorylation du complexe p95C/p14N, déclenchée par ajout d'EGTA et d'ATP froid (en présence d'un système régénérateur d'ATP afin d'éviter la formation d'ADP), est très lente. Si la phosphorylation par l'ATP n'est pas trop affectée par la coupure en Leu119-Lys120, cette coupure a donc des conséquences importantes en ce qui concerne la capacité qu'a l'ATPase à se déphosphoryler.

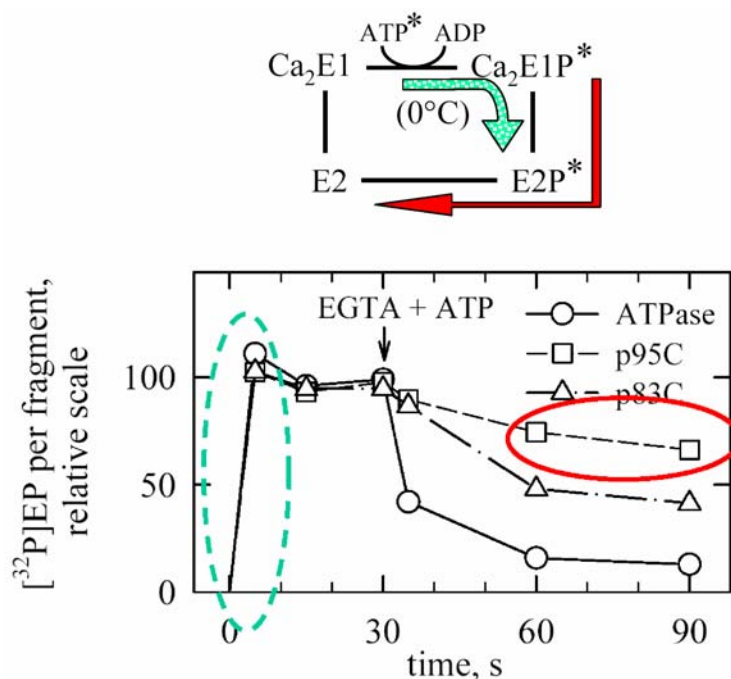


Figure 3. Phosphorylation par le $[\gamma\text{}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ à l'état stationnaire des fragments de coupures obtenus en absence de Ca^{2+} , et déphosphorylation induite par l'addition simultanée d'EGTA et d'ATP non radioactif.

Nous nous sommes alors ensuite intéressés aux propriétés de p95C/p14N vis-à-vis de sa vitesse de phosphorylation par le $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ et de la vitesse de déphosphorylation de la forme E2P ainsi formée (Figure 4).

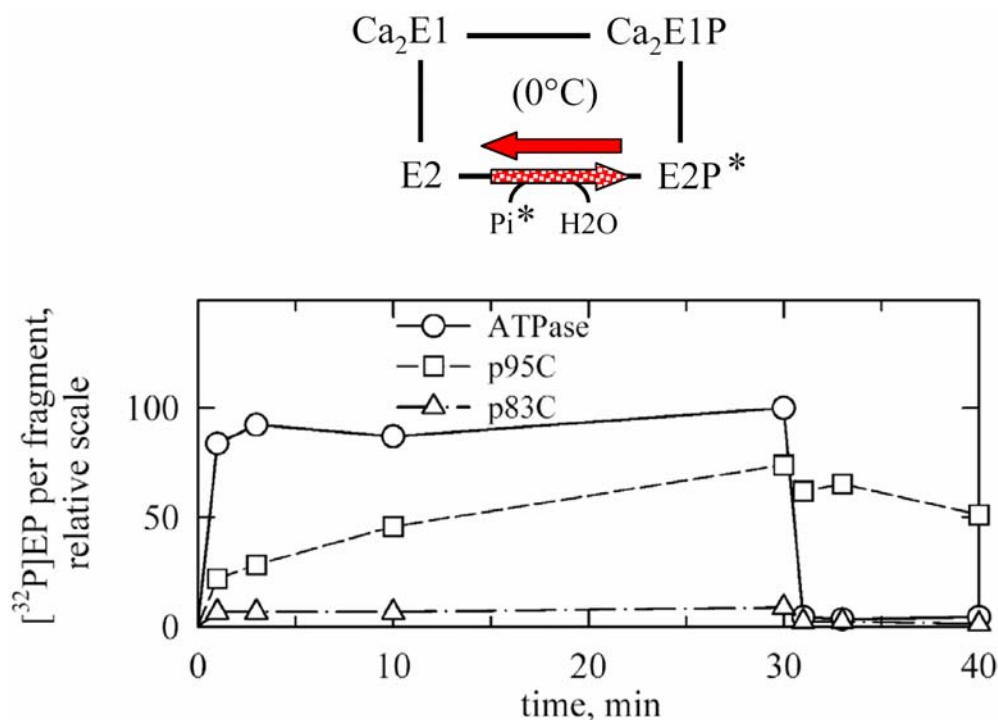


Figure 4. Vitesses de phosphorylation par le $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ et de déphosphorylation des fragments de coupures obtenus en absence de Ca^{2+} (DMSO 25 %, 0°C , pH 7)

La phosphorylation par le [^{32}P]Pi du fragment p95C/p14N, ici mesurée en présence de DMSO, est très significativement ralentie par rapport à l'ATPase native (Figure 4). Par ailleurs, nous confirmons le résultat de 2002 concernant l'incapacité totale de p83C à être phosphorylé par le Pi (Møller et al. 2002). En outre, quand le dérivé phosphorylé formé (E2P) est dilué 10 fois dans un tampon de déphosphorylation (ici Mops-Tris 50 mM, KCl 100 mM, Mg^{2+} 5 mM), la déphosphorylation de p95C/p14N est de nouveau extrêmement ralentie par rapport à celle de l'ATPase intacte : les transitions $\text{E2} \rightarrow \text{E2P}$ et $\text{E2P} \rightarrow \text{E2}$ sont donc toutes les deux très ralenties. Par ailleurs, nous avons montré que la phosphorylation à l'équilibre par le [^{32}P]Pi du complexe p95C/p14N se fait avec une affinité pour le Pi quasi normale : ces mesures d'affinité nous ont servi à illustrer le protocole de mesure du dérivé phosphorylé dans notre chapitre de Matériel et Méthodes (cf Figure 5 du Chapitre III). La réduction dramatique simultanée des vitesses de phosphorylation et de déphosphorylation est cohérente avec une perturbation de l'état de transition formé pendant la phosphorylation par le Pi et pendant la déphosphorylation.

Finalement, nous avons aussi mesuré au « quench flow » la vitesse (en présence d'ATP) de la transition des formes dépourvues de calcium vers les formes complexées au calcium et donc phosphorylables (et phosphorylées) par l'ATP, à 20°C (Figure 5).

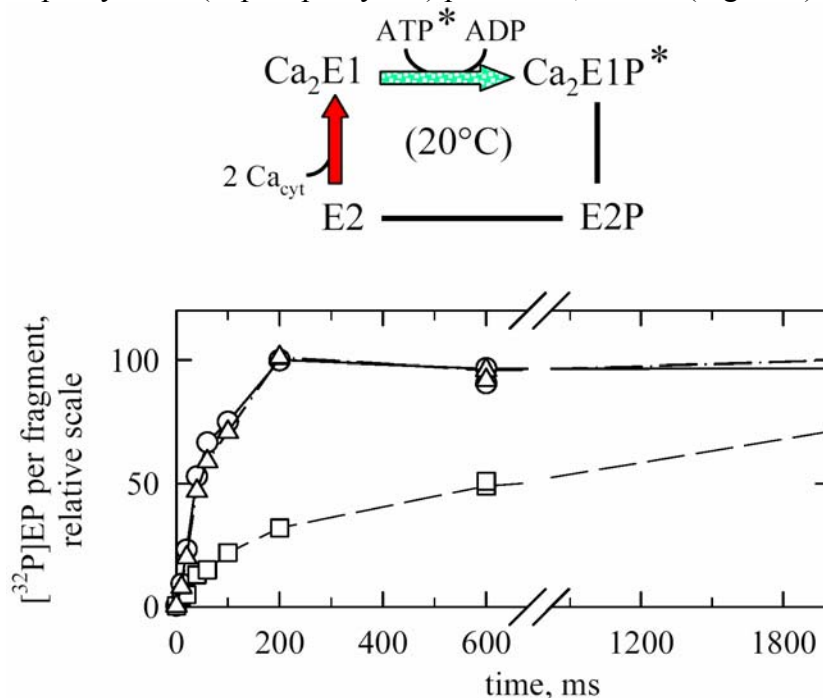


Figure 5. Phosphorylation par le [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP de l'ATPase intacte (symboles ronds) et de ses fragments p95C (carrés) et p83C (triangles), mesurée à température ambiante en « quench flow », en partant de la forme E2 dépourvue de Ca^{2+}

La phosphorylation par le [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP quand l'enzyme a été préalablement incubée en absence de Ca^{2+} (symboles carrés sur la Figure 5) est plus lente pour le fragment p95C/p14N que pour ATPase résiduelle ou p83C/p28N. Ceci suggère que la transition $\text{E2} \rightarrow \text{E1}$ de p95C/p14N est également ralentie. Des résultats tout à fait similaires ont été trouvés lorsque la même réaction a été mesurée dans la glace, sur des temps plus longs.

Conclusions:

Ce travail nous a permis de démontrer l'utilité de la combinaison de protocoles de phosphorylation et de séparation électrophorétique pour étudier l'effet d'une coupure protéolytique sur différentes étapes du cycle. Ainsi, nous avons pu montrer qu'une coupure entre le domaine A et le segment transmembranaire M2 induisait des effets spécifiques sur le cycle catalytique, distincts des effets induits par une coupure entre le domaine A et le segment transmembranaire M3. Si l'étape de phosphorylation par l'ATP n'est que modérément affectée par la coupure entre le domaine A et M2, les réactions de phosphorylation par le Pi et de déphosphorylation sont très ralenties, alors que la transition $E2 \rightarrow E1Ca_2$ n'est, elle aussi, que modérément touchée.

Pendant longtemps, le rôle du domaine A est resté mystérieux. Mais nos résultats ont suggéré qu'un positionnement précis du domaine A était particulièrement important pour l'ATPase au moment de sa déphosphorylation : nous avons donc conclu que le domaine A jouait sans doute un rôle critique lors de la phase « phosphatase » du cycle, et que la séquence conservée du domaine A, la séquence TGES, n'était sans doute pas étrangère à cet effet. Depuis, ceci est devenu particulièrement clair. Récemment, des études de mutagenèse dirigée de résidus du domaine A ont abouti à des résultats similaires aux nôtres (Daiho et al. 2003; Kato et al. 2003). Et les structures cristallographiques de complexes plus ou moins analogues à l'état de transition formé lors de la déphosphorylation ($E2.A1F_4$ et à une moindre mesure $E2.MgF_4$ (Olesen et al. 2004; Toyoshima et al. 2004)) ont réglé définitivement la question, bien mieux que nous n'aurions jamais pu le faire : TGES, arrivé au voisinage du site actif grâce à la réorientation d'ensemble du domaine A dans les formes « E2P-like », permet le positionnement adéquat d'une molécule d'eau pour que le dérivé phosphorylé puisse être attaqué (cf. Introduction, Fonctionnement de l'ATPase)

2. ATPase mutée : rôle de la « boucle L6-7 » dans l'activation de l'ATPase- Ca^{2+} par le Ca^{2+} et l'ATP (Manuscrit # 2)

Des études de mutagenèse dirigée et de protéolyse ménagée ont initialement suggéré que la boucle reliant les segments transmembranaires M6 et M7, la « boucle L6-7 » entre les résidus Phe808 et Ser830, avait des propriétés importantes. Notamment, la mutation de résidus acides particuliers semblait réduire fortement la dépendance en Ca^{2+} de l'hydrolyse de l'ATP par SERCA (Falson et al. 1997). Il a alors été explicitement suggéré que cette boucle avait un rôle dans l'activation de l'ATPase par le Ca^{2+} (Menguy et al. 1998), voire même un rôle de pré-fixation des ions Ca^{2+} (Menguy et al. 2002). Toutefois d'autres études de mutagenèse dirigée ont privilégié plutôt pour cette boucle un rôle de stabilisation de la structure de l'ATPase et de communication entre domaines cytosoliques et membranaires (Zhang et al. 2001), et les structures cristallographiques ont été interprétées plutôt dans ce dernier sens (Toyoshima et al. 2000).

Le travail que je présente maintenant a été effectué dans le but de mieux caractériser les implications fonctionnelles d'une (double) mutation dans cette boucle. Le mutant que nous avons caractérisé a été baptisé ADA car il s'agit d'un mutant dans lequel deux acides aspartiques, D813 et D818, ont été mutés pour des alanines. Ces résultats ont fait eux aussi l'objet d'une publication dont nous avons inséré une copie à la fin de ce chapitre.

Ce mutant exprimé dans la levure a d'abord été purifié et reconstitué en phospholipides. La relative pureté des préparations obtenues nous a permis de mesurer l'affinité « vraie » pour le Ca^{2+} de l'ATPase mutée (et aussi de l'ATPase sauvage, pour contrôle), grâce à la fluorescence émise par les résidus tryptophanes (Trp). Les expériences ont été réalisées avec un spectromètre Spex Fluorolog décrit précédemment (cf chapitre III), pour lequel les longueurs d'ondes ont été réglées à 290 et 330 nm, avec des largeurs de fente de 2 et 20 nm, respectivement. Ces conditions spectrales ont été choisies de manière à récolter le plus de fluorescence possible tout en maintenant la photolyse dans des limites acceptables. Dans ces conditions, nous avons pu enregistrer des signaux décents malgré la dilution des ATPase exprimées : 5 μg de protéine/ml pour l'ATPase purifiée et reconstituée, sauvage ou mutante, contre 100 μg de protéine/ml en général lorsque nous travaillons avec du SR.

Les mesures ont été effectuées dans un tampon Mops-Tris 150 mM (nous utilisons une concentration de tampon élevée afin d'éviter tout signal de fluorescence -dû aux protéines contaminantes ou inactivées- à l'occasion d'éventuels changements de pH au moment des additions), et en absence de KCl et de Mg^{2+} afin de maximiser les changements de fluorescence liés au Ca^{2+} (Guillain et al. 1982). Dans ces conditions expérimentales, nous observons pour l'ATPase sauvage des changements de fluorescence relative d'amplitudes un petit peu plus faibles que pour du SR natif (ceci est dû en partie à la présence de protéines contaminantes ou partiellement dénaturées, qui ne répondent pas au calcium), mais raisonnablement reproductibles. La concentration de Ca^{2+} présente initialement est de l'ordre de 55 μM . Nous ajoutons d'abord 500 μM d'EGTA ; puis nous faisons des additions successives de 300 μM de Ca^{2+} afin d'obtenir des concentrations de Ca^{2+} libres de l'ordre de 1 μM (en se basant sur un $\text{Kd}_{\text{Ca-EGTA}}$ de 0,4 μM), 155 et 455 μM . Les traces observées sont illustrées sur la Figure 6A. La « dérive » continue de la fluorescence dont elles sont affectées, en partie liée la photolyse, en partie à l'adsorption des vésicules sur les parois de la cuvette, est classique dans ces études. Les variations de fluorescence lors des changements de concentration de Ca^{2+} libre, reportées sur la Figure 6B, définissent l'affinité avec laquelle l'ATPase sauvage ou mutée fixe le Ca^{2+} .

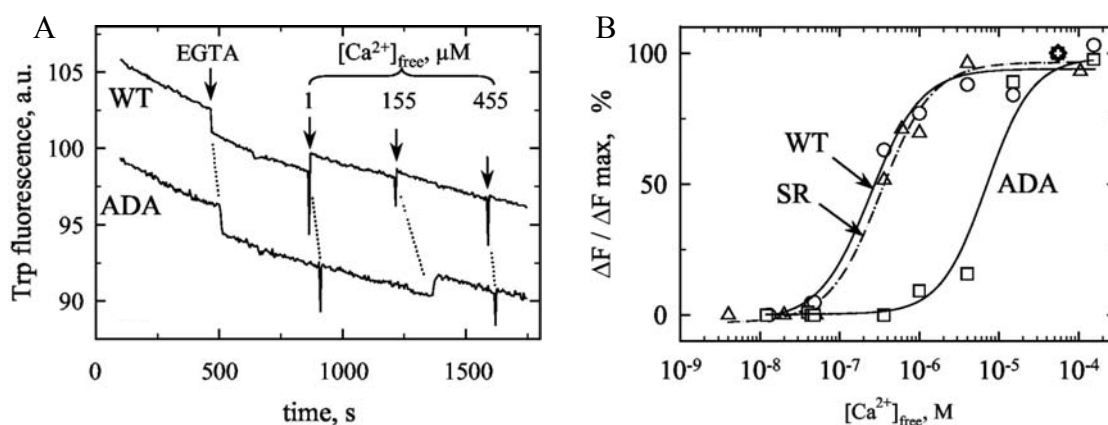


Figure 6. A: Variations de fluorescence des Trp de l'ATPase, sauvage ou bien mutée sur les résidus D813 et D818. B: Affinité de ces ATPases pour le Ca^{2+} (« SR » fait référence aux mesures correspondantes avec des membranes de SR natives)

Nous déduisons de ces mesures un Kd de l'ordre de 0,3 μM pour l'ATPase sauvage, en accord avec ce qui peut être mesuré sur le réticulum dans des conditions identiques, et aussi avec ce qui a été décrit pour ce dernier dans la littérature (Forge et al. 1993). Par contre, le mutant ADA fixe le Ca^{2+} avec une affinité significativement plus faible (de l'ordre de 8 μM), d'un facteur 20 à 30.

Nous avons également réalisé des mesures de fluorescence avec ces mêmes ATPases purifiées et reconstituées, mais maintenant marquées au FITC. Le marquage a eu lieu dans des conditions voisines de celles décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes, avec toutefois quelques modifications: le marquage est réalisé à 10 $\mu\text{g/ml}$ de l'ATPase exprimée et purifiée (*i.e.* diluée 10 fois par rapport à sa concentration après reconstitution), en présence de FITC à concentration 2 μM , et pendant 10 minutes à 20°C dans un tampon Tricine-Tris 10 mM (pH 8), sucrose 0,3 M, Mg^{2+} 1,1 mM, Ca^{2+} 110 μM , glycérol 4 % et KCl 10 mM (la composition de ce milieu tient compte du fait que le tampon qui sert à stocker les enzymes après reconstitution contient déjà du Mg^{2+} , du Ca^{2+} , du glycérol et du KCl). On sépare ensuite le FITC libre du FITC ayant réagi avec l'ATPase, au moyen d'une colonne PD-10 préalablement équilibrée avec un tampon Mops-Tris 150 mM (pH 7) et Ca^{2+} 100 μM . Les spectres de fluorescence sont ensuite réalisés dans un tampon Mops-Tris 150 mM, KCl 100 mM et Mg^{2+} 5 mM à pH 7 et 20°C (légèrement différent, donc, de celui utilisé précédemment pour la fluorescence des Trp). La fluorescence du FITC est mesurée en réglant la longueur d'onde d'excitation à 490 nm et la longueur d'onde d'émission à 530 nm, avec des largeurs de fente de 5 nm à l'excitation et à l'émission. Les mesures de fluorescence du FITC lié ont confirmé la plus faible affinité avec laquelle le Ca^{2+} se fixe sur ADA, en comparaison de la protéine exprimée sauvage ou de la protéine native (résultats non montrés).

D'autres étapes du cycle ont été étudiées par fluorescence. Il est par exemple possible de déterminer la phosphorylation par le P_i en utilisant la même technique de fluorescence intrinsèque à l'équilibre. Des ajouts successifs de P_i augmentent la fluorescence avec la même affinité pour ADA que pour les ATPases sauvages (résultats non montrés).

Des mesures de phosphorylation par le $[\text{}^{32}\text{P}]\text{P}_i$ en fonction de la concentration de Ca^{2+} ont également été réalisées, en suivant le protocole décrit dans le chapitre III. La concentration de Ca^{2+} nécessaire pour inhiber cette étape de phosphorylation par le P_i est 20 fois plus grande pour ADA que pour l'enzyme sauvage: ceci est cohérent avec une diminution de l'affinité vraie pour le Ca^{2+} .

Enfin, des mesures phosphorylation par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ont été réalisées. Le principe de la mesure de phosphorylation reste le même que précédemment décrit pour des membranes de SR, mais les quantités d'ATPases exprimée et purifiées disponibles sont moins importantes. La phosphorylation a été ici initiée par l'ajout de 2 μM de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (2 mCi/ μmol) à des ATPases à la concentration de 2 $\mu\text{g/ml}$, dans le tampon Mops-Tris 50 mM, KCl 100 mM et Mg^{2+} 5 mM (pH7).

Plusieurs de ces mesures ont été réalisées à température ambiante, au moyen de l'appareillage de « quench flow » décrit dans le chapitre III (Figure 12). La réaction de phosphorylation par l'ATP y est stoppée par arrêt acide (« quenching ») dans un milieu acide $\text{TCA}/\text{H}_3\text{PO}_4$, ici de concentrations 0,5 M et 30 mM final, respectivement.

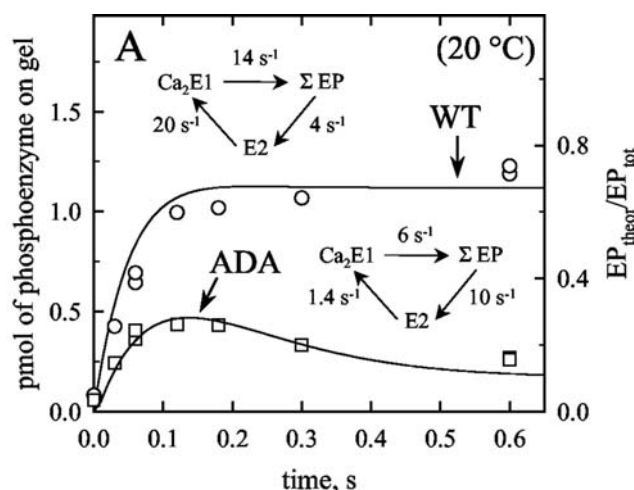


Figure 7. Phosphorylation de l'ATPase sauvage (WT) et mutée (ADA) par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, mesurée sur des temps courts grâce à la méthodologie QFM

Dans ces mesures de cinétique de phosphorylation sur des temps courts à 20°C, nous observons que la phosphorylation de ADA passe par un maximum au bout de 150 msec, qui correspond à environ 40 % du niveau atteint par l'ATPase sauvage, puis redescend pour atteindre un niveau stationnaire correspondant à environ 20 % du niveau atteint par le sauvage à l'état stationnaire: le niveau de dérivé phosphorylé atteint à l'état stationnaire est significativement plus bas pour ADA que pour l'enzyme sauvage.

Nous avons montré par ailleurs que la vitesse de déphosphorylation était légèrement accélérée pour ADA (voir article joint). Nous avons alors essayé de modéliser le cycle catalytique de l'ATPase en simplifiant le système à seulement trois espèces: une espèce qui a fixé le Ca^{2+} (« $\text{Ca}_2\text{E1}$ »), une espèce fictive qui regroupe les diverses formes phosphorylées (« ΣEP »), et une espèce déphosphorylée et dépourvue de Ca^{2+} (« E2 »). Pour la modélisation, nous imposons au système des contraintes cohérentes avec les expériences réalisées: i) le niveau de dérivé phosphorylé atteint par ADA doit être inférieur à celui atteint par le sauvage, à la fois à son maximum et à l'état stationnaire, et ii) la vitesse de déphosphorylation doit être plus grande pour ADA que pour le WT. Divers essais de simulation montrent que la transition $\text{E2} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E1}$ doit être significativement ralentie pour reproduire les résultats expérimentaux. Ce ralentissement et l'accélération de la déphosphorylation contribuent tous les deux à l'accumulation de formes non phosphorylées, ainsi qu'à la formation d'un « overshoot » dans la quantité de dérivé phosphorylé pour ADA.

Conclusions:

Des mesures de fluorescence intrinsèque ou extrinsèque à l'équilibre nous ont permis de vérifier que la mutation de résidus critiques de la boucle reliant les domaines transmembranaires M6 et M7 aboutit bien à une diminution réelle de l'affinité de l'ATPase pour le Ca^{2+} . Cette diminution de l'affinité « vraie » est cependant plus modeste que la diminution de l'affinité apparente que l'on avait cru voir précédemment sur les mesures de dérivé phosphorylé (Menguy et al., 1998). Elle est sans doute principalement due au ralentissement de la transition $\text{E2} \rightarrow \text{E1}$ suggéré par les mesures de phosphorylation par le $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ que nous avons réalisées sur des temps courts. L'affinité apparente avec laquelle le Ca^{2+} active l'ATPase redevient d'ailleurs quasiment normale à forte concentration d'ATP, lorsque ces fortes concentrations d'ATP accélèrent la transition $\text{E2} \rightarrow \text{E1}$ (cf. article joint).

Toutefois, la double mutation ADA semble aboutir également à une perte de l'affinité pour l'ATP (voir article joint). De même, nous avons vu que le mutant avait une vitesse de déphosphorylation après phosphorylation par l'ATP un peu plus rapide que pour le sauvage. Les mutations D813A et D818A affectent donc sans doute aussi d'autres étapes du cycle catalytique que la transition E2-E1. Les données expérimentales présentées dans ce travail renforcent donc l'hypothèse du rôle important de la boucle L6-7 dans la coordination des différents événements entre domaines cytosoliques et membranaires.

Manuscrit # 1:

Functional properties of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase after proteolytic cleavage at Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰, close to the *A*-domain.

Lenoir, G., Picard, M., Gauron, C., Montigny, C., Le Maréchal, P., Falson, P., le Maire, M., Møller, J.V., and Champeil, P. (2004)

J. Biol. Chem. 279, 9156-9166.

Functional Properties of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase after Proteolytic Cleavage at Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰, Close to the A-domain^[S]

Received for publication, October 17, 2003, and in revised form, December 8, 2003
Published, JBC Papers in Press, December 12, 2003, DOI 10.1074/jbc.M311412000

Guillaume Lenoir[‡], Martin Picard[‡], Carole Gauron[‡], Cédric Montigny[‡], Pierre Le Maréchal[§],
Pierre Falson[‡], Marc le Maire[‡], Jesper V. Møller[¶], and Philippe Champeil[‡]||

From the [‡]Service de Biophysique des Fonctions Membranaires (Département de Biologie Joliot-Curie, CEA), Unité de Recherche Associée 2096, CNRS, Laboratoire de Recherche Associée-17V and Institut Fédératif de Recherche-46, Université Paris-Sud, CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France, the [§]Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, Equipe Chimie des Protéines, Unité Mixte de Recherche CNRS 8619 and IFR-46, Université Paris Sud, Bat 430, F-91405 Orsay Cedex, France, and the [¶]Department of Biophysics, University of Aarhus, Ole Worms Allé 185, 8000 Aarhus C, Denmark

By measuring the phosphorylation levels of individual proteolytic fragments of SERCA1a separated by electrophoresis after their phosphorylation, we were able to study the catalytic properties of a p95C-p14N complex arising from SERCA1a cleavage by proteinase K between Leu¹¹⁹ and Lys¹²⁰, in the loop linking the A-domain with the second transmembrane segment. ATP hydrolysis by the complex was very strongly inhibited, although ATP-dependent phosphorylation and the conversion of the ADP-sensitive E1P form to E2P still occurred at appreciable rates. However, the rate of subsequent dephosphorylation of E2P was inhibited to a dramatic extent, and this was also the case for the rate of “backdoor” formation of E2P from E2 and P_i. E2P formation from E2 at equilibrium nevertheless indicated little change in the apparent affinity for P_i or Mg²⁺, while binding of orthovanadate was weaker. The p95C-p14N complex also had a slightly reduced affinity for Ca²⁺ and exhibited a reduced rate for its Ca²⁺-dependent transition from E2 to Ca₂E1. Thus, disruption of the N-terminal link of the A-domain with the transmembrane region seems to shift the conformational equilibria of Ca²⁺-ATPase from the E1/E1P toward the E2/E2P states and to increase the activation energy for dephosphorylation of Ca²⁺-ATPase, reviving the old idea of the A-domain being a phosphatase domain as part of the transduction machinery.

Large scale relative movements of the three main sub-domains in the cytosolic head of P-type ATPases, as well as associated movements of the transmembrane segments to which these domains are connected, probably play a major role in the active transport mediated by these membrane proteins (1, 2). We have therefore become interested in the functional effects of proteolytic disruption of the integrity of the loops connecting these various ATPase domains. For rabbit SERCA1a,¹ a representative of P-type ATPases involved in

Ca²⁺ transport into intracellular compartments, we have previously studied how Ca²⁺ transport and ATP hydrolysis are affected by proteolytic cleavage at a site located in the segment linking the A-domain with the third transmembrane segment, M3 (3). In that previous work, the proteolysis conditions had allowed us to obtain relatively large (milligram) amounts of fairly pure “p83C-p28N” peptide complexes, derived from ATPase by excision of a short ²³⁹MAATF²⁴³ sequence from this segment, and procedures that previously had been developed to study the catalytic cycle of intact ATPase were used unaltered to study the properties of the proteolytic product. The results showed that the cleaved ATPase was deficient in Ca²⁺ transport but remained phosphorylatable by ATP in a manner indistinguishable from that of intact ATPase. A detailed study of the partial reactions revealed that a major defect resulting from proteolysis was the difficulty for the cleaved ATPase to enter what is known as the “E2P” state, *i.e.* the ADP-insensitive form of phosphoenzyme. In the present work, we have aimed at studying whether SERCA1a function is affected by proteolytic cleavage in another part of the link between the A-domain and the membrane. To do so, we again resorted to proteolytic attack by proteinase K, but instead of performing the proteolysis in the presence of Ca²⁺ and AMP-PCP, we now treated the ATPase in the absence of Ca²⁺ and nucleotide: this is known to allow cleavage at Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰, in the segment linking the A-domain with the second transmembrane segment, resulting in the formation of complementary “p14N” and “p95C” peptides (4). In this case, however, proteolysis also simultaneously occurs at other sites, so that a mixture of peptides is formed, among which p95C is only present in relatively small amounts compared with p83C or residual intact ATPase. To study the catalytic properties of the “p95C-p14N” complex, we therefore had to resort to new procedures. We combined two types of established experiments: first, after phosphorylation of the various peptides, we separated them by electrophoresis under conditions previously found to allow adequate separation between fragments of large size and yet minimize dephosphorylation (5); second, we made use of various phosphorylation and dephosphorylation protocols previously used to character-

* This work was supported by the Human Frontier Science Program Organization (Grant RGP 0060/2001-M) through financial support of M. P. and C. G., and by the Ministère Français de la Recherche and the Fondation pour la Recherche Médicale through financial support of G. L. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. A–M and additional text.

|| To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-1-6908-3731; Fax: 33-1-6908-8139; E-mail: champeil@dsvidf.cea.fr.

¹ The abbreviations used are: SERCA1a, sarcoplasmic-endoplasmic

reticulum calcium ATPase 1a; SR, sarcoplasmic reticulum; PK, proteinase K; Mops, 4-morpholinepropanesulfonic acid; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight; DM, β -D-dodecyl maltoside; C₁₂E₈, octaethylene glycol monododecyl ether; TEMED, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine; AMP-PCP, adenosine 5'-(β , γ -methylene)triphosphate; Tricine, N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine; Ca_{1/2}, Ca²⁺ concentration for 50% of maximal effect; PCA, perchloric acid.

ize kinetically the individual steps in the catalytic cycle of heterologously expressed ATPase mutants. This allowed us to simultaneously study to what extent the p95C and the p83C peptides were phosphorylated or dephosphorylated under various situations and to compare their properties with those of residual intact ATPase. Results concerning the p83C-p28N complex were consistent with those that we had previously obtained with conventional methods (3). The present report therefore focuses on the catalytic properties of the p95C-p14N complex resulting from cleavage of the Lys¹¹⁹-Leu¹²⁰ bond: we find that following this cleavage Ca²⁺-ATPase turnover is severely perturbed but in a manner quite different from that obtained by excision of the ²³⁹MAATE²⁴³ sequence in the peptide chain linking the A-domain with M3. The results make it possible to get a better understanding of the role of the A-domain for the intermediary processes involved in Ca²⁺ transport.

MATERIALS AND METHODS

Proteolysis by Proteinase K—For controlled proteolysis of sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺-ATPase, SR membranes (6) were suspended at a concentration of 2 mg protein/ml in a 100 mM Mops-NaOH medium (pH 6.5) containing 5 mM Mg²⁺ and 0.5 mM EGTA, and treated with PK at 0.03 mg/ml, generally for 15 min at 20 °C unless otherwise indicated. Proteolysis was stopped by adding 0.5 or 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (as well as 0.6 mM Ca²⁺ in some cases) and storing the samples on ice for 10 min. For some of the phosphorylation experiments, namely those involving [γ -³²P]ATP, the preparation with inactivated PK was used without further treatment as detailed below. For other phosphorylation experiments, namely those involving [³²P]P_i that were best performed with a higher concentration of protein than those involving [γ -³²P]ATP, a large batch of PK-treated concentrated membranes was first prepared (see Supplemental Material).

Phosphorylation and Dephosphorylation—Phosphorylation from [γ -³²P]ATP of ATPase fragments was generally measured on ice, by adding 5 μ M [γ -³²P]ATP (at 0.5 mCi/ μ mol) to PK-treated membranes suspended at 0.2 mg/ml in buffer A (100 mM KCl, 5 mM Mg²⁺, and 50 mM Mops-Tris, adjusted to pH 7.0 at room temperature), supplemented with various concentrations of Ca²⁺ (or a Ca²⁺/EGTA buffer) (typically 600 μ l per sample). When desired, ATPase dephosphorylation was subsequently triggered by adding EGTA and the appropriate additive, with only small dilution (see below for details). In some cases, phosphorylation was also measured after a few milliseconds reaction at 20 °C, with a Biologic QFM5 quenched-flow apparatus (48).

Phosphorylation from [³²P]P_i of ATPase fragments was measured by adding [³²P]P_i (at 0.5 mCi/ μ mol), generally at 200 μ M, to concentrated PK-treated membranes suspended at 1–2 mg/ml in buffer B (10 mM Mg²⁺, 1 mM EGTA, and 50 mM Mops-Tris, adjusted to pH 7.0, at room temperature) supplemented with 25% Me₂SO (v/v) (typically 60 μ l per sample). When desired, ATPase dephosphorylation was then triggered either by adding excess non-radioactive P_i (resulting in only little dilution; experiments of this kind were performed at 20 °C), or by 10-fold dilution of the phosphorylated sample into an Me₂SO-free, KCl-containing, and ATP-containing buffer (experiments of this kind were performed on ice, see below).

In all cases the reaction was stopped by acid quenching with trichloroacetic acid (or in some cases PCA) and phosphoric acid, at final concentrations of 500 mM and 30 mM, respectively (typically in a total volume of 900 μ l). Generally, the quenched sample, previously left on ice for 20 min, was pelleted by centrifugation (15,000 rpm for 25 min, 4 °C). The supernatant was sucked off and replaced by an equivalent volume of acid solution (diluted 10-fold compared with the final quenching solution), and the sample was centrifuged as before. After removal of the second supernatant, the pellet was resuspended in 250 μ l of a sample buffer containing 2% SDS, 10 mM EDTA, 150 mM Tris-HCl (at pH 6.8), 16% (v/v) glycerol (or 8 M urea in some cases), 0.8 M β -mercaptoethanol, and 0.04% bromophenol blue, by vortexing for 1 min (thorough vortexing was found to be critical for reproducible resuspension of the acid-treated pellet); 20- μ l aliquots were then loaded onto gel for electrophoretic separation as described below.

Electrophoretic Separation and ³²P Counting—This was performed according to protocols previously described (5, 7–9; see also Ref. 10 for a related approach), but with some modifications. The stacking gel contained 4% acrylamide (with an acrylamide to bisacrylamide ratio of 29 to 1), 65 mM Tris-H₃PO₄, pH 5.5, 0.1% SDS, 2% ammonium persulfate,

and 0.1% TEMED. The separating gel was a continuous 7% gel, containing 65 mM Tris-H₃PO₄, pH 6.5, 0.1% SDS, 0.4% ammonium persulfate, and 0.05% TEMED. Unless otherwise indicated, gels were run in a cold room. The pre-cooled running buffer contained 170 mM Mops-Tris, pH 6.0 and 0.1% SDS; it was kept under stirring during electrophoresis to prevent heating of the gels. Electrophoresis lasted about 3 h, with a current intensity set constant to 10 mA/gel (70–80 V). Gels were then stained and fixed for 10 min in 40% methanol, 10% acetic acid, and 0.1% Coomassie Blue R-250. Destaining was carried out in 10% acetic acid, 10% methanol, and 1% glycerol within less than 1 h, and the gels were then dried overnight between two sheets of cellophane paper, prior to exposure to a phosphor screen the next morning. Radioactivity was revealed with a STORM 860 PhosphorImager (Amersham Biosciences) and quantified by comparison with known amounts of [γ -³²P]ATP or [³²P]P_i.

In some cases, samples were also run in a Laemmli-type system (e.g. see Fig. A in Supplemental Material). This was especially the case for simple immuno-decoration experiments, performed as previously described (3). Tricine gels were also sometimes used for peptide separation (4).

Solubilization and Elution of the p95C-p14N Complex in the Presence of Detergent—After proteolysis, solubilization with C₁₂E₈ or DM was sometimes performed and followed by chromatography on a detergent-equilibrated size exclusion column, essentially as previously described (e.g. Refs. 3 and 11). Selected fractions were used for SDS-PAGE and immuno-reactivity analysis (see Supplemental Material), whereas other aliquots were used for MALDI-TOF analysis (see below) of p14N, either without further separation, or after additional trypsinolysis (12) (see Supplemental Material).

Mass Spectrometry Analysis—After sample preparation (see Supplemental Material), spectra were acquired on a MALDI-TOF spectrometer (PerSeptive Biosystems, Voyager STR-DE) equipped with a nitrogen laser (337 nm), in linear mode or in reflector mode (see Supplemental Material).

Edman Degradation Analysis and Other Methods—After SDS-PAGE separation of PK-treated fragments on an 8% Laemmli gel (with 1 mM thioglycolate in the running buffer), the N terminus of the blotted p95C fragments was sequenced using a Procise (Applied Biosystems) protein sequencer.

Low concentrations of free Ca²⁺ were obtained by buffering with EGTA, using the following apparent dissociation constants for Ca²⁺ and Mg²⁺ at pH 7: $K_{dCa-EGTA} \sim 0.4 \mu$ M and $K_{dMg-EGTA} \sim 25$ mM. Structures were visualized using the SwissPDB Viewer (Ref. 13; available at www.expasy.org/spdbv/). Additional information has been deposited as web-available Supplemental Material, together with several figures and more detailed discussion.

RESULTS

Multiple Fragmentation of Ca²⁺-ATPase Treated with PK: Formation of a p95C-p14N Complex in the Absence of Ca²⁺ and Assay of Phosphorylatable Proteolytic Peptides with Sarkadi Gels—The typical pattern of ATPase proteolysis by PK in the presence or absence of Ca²⁺, as deduced from electrophoresis on Laemmli gels, is shown in the *top panel* of Fig. 1, *lanes 2–5* in this *panel* show that, as previously documented, treatment of SR vesicles with PK in the presence of Ca²⁺ gives rise to a number of well characterized initial products, comprising membranous peptides derived from either the N-terminal (p28N) or the C-terminal part (p83C and p19C) of the ATPase, together with water-soluble p29/30 fragments derived from the central nucleotide binding domain (4, 14). In the absence of Ca²⁺, fragments with the same apparent masses as the p83C and p28N bands again show up (*lanes 6–9* in Fig. 1A), but in this case a new band with a higher molecular mass, the “p95” peptide is also transiently formed in the first 15 min, together with a new p14 band; both p95C and p14N bands are degraded after 60 min (compare *lanes 6–9* with *lanes 2–5*, and see similar results in Refs. 4 and 15). This p95 band represents a C-terminal peptide that previously was found to arise from ATPase cleavage at Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰ (4), and by Edman degradation analysis we confirmed herein this assignment (data not shown). Thus, the absence of Ca²⁺ appears to result in an increased susceptibility of the ATPase chain to PK cleavage at

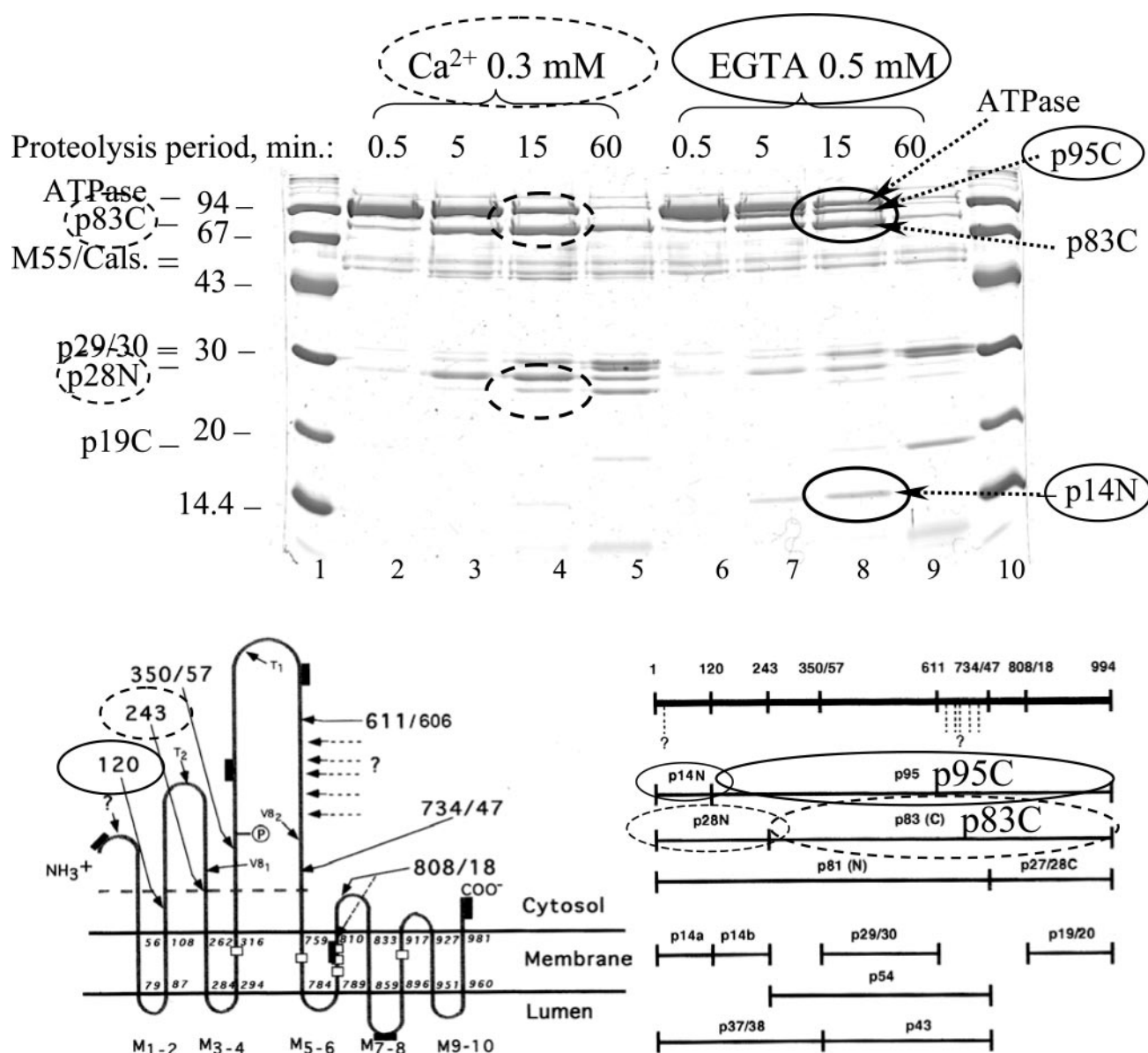


FIG. 1. Proteinase K (PK) treatment in the absence of Ca²⁺ results in cleavage at Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰ and formation of a p95C-p14N complex (together with other peptides). Sarcoplasmic reticulum (SR) membranes (2 mg of protein/ml) were treated with PK (0.03 mg/ml) at 20 °C in proteolysis buffer (100 mM Mops-NaOH, 5 mM Mg²⁺, pH 6.5), in the presence of 0.3 mM Ca²⁺ (lanes 2–5) or the presence of 0.5 mM EGTA (lanes 6–9). Here, after proteolysis arrest, aliquots of the various samples were added to a urea-containing denaturation buffer (essentially as described in Ref. 46), boiled, and loaded (about 4 µg of protein per lane) onto a 12% SDS-PAGE Laemmli gel prepared in the presence of 1 mM Ca²⁺. Lanes 1 and 10 contain molecular mass markers (“LMW” Amersham Biosciences kit). The bottom part of the figure schematizes the identified points of primary cleavage and the various proteolytic products. Note that because Fig. B in Supplemental Material shows that p95C and p14N fragments remain associated after membrane solubilization by detergent, these fragments can be considered to remain associated in the PK-treated membrane itself.

Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰. For convenience, the bottom part of Fig. 1 (adapted from Fig. 3 in Ref. 4) recalls the position of the main identified cleavage points on Ca²⁺-ATPase, as well as some of the resulting peptides.

For functional studies, the question whether the complementary p14N and p95C fragments arising from the above-described cleavage remain associated in the membrane is an important issue. To address this question, after treatment with PK we solubilized the treated SR membranes with a mild detergent (C₁₂E₈ or DM) and chromatographed the solubilized sample on a high-performance liquid chromatography size exclusion column equilibrated in the presence of the same detergent. By both Western blotting and Coomassie Blue staining, we found that the small p14N peptide indeed elutes at the position where monomeric intact ATPase normally elutes, and

where, after PK treatment, the p83C-p28N complex resulting for cleavage at Thr²⁴²-Glu²⁴³ also elutes together with residual intact ATPase (3): *i.e.* p14N presumably elutes in association with the larger p95C peptide (Fig. B in Supplemental Material). Furthermore, judging from Coomassie Blue staining, p95C and p14N are present in these fractions (corresponding to the “monomeric” region of the elution pattern) in relative amounts consistent with the formation of stoichiometric complexes (Fig. C in Supplemental Material), suggesting that the two ATPase fragments resulting from cleavage at Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰ remain closely associated despite the presence of detergent, as was previously demonstrated for the p83C and p28N fragments (3). We therefore consider it likely that the former fragments also remain associated in the membrane after cleavage, hence our designation of these fragments in the remainder

of this paper as a p95C-p14N complex.

We checked that after cleavage in the absence of Ca²⁺, the N-terminal peptide formed, p14N, does have its C-terminal end at Leu¹¹⁹, i.e. that proteinase K has not cleaved off a few more residues on the C-terminal side of this peptide as we previously found to be the case for the p83C-p28N complex. Mass spectrometry analysis showed that the 1–119 peptide was indeed not subject to further degradation (Fig. D in Supplemental Material) (and simultaneously confirmed that, as previously established (16), the N terminus of Ca²⁺-ATPase is acetylated). The identity of the p14N fragment is thus fully established. Note that this p14N fragment, formed after cleavage in the absence of Ca²⁺, was previously designated as p14a in Ref. 4 (and, in the legend to Table I of that report, it was erroneously indicated that this peptide corresponded to residues 1–19, instead of 1–119). After treatment with PK for 15 min in the absence of Ca²⁺, the amount of the p95C-p14N complex formed is somewhat smaller than that of undegraded ATPase and definitely smaller than the amount of p83C-p28N complex; after longer proteolysis periods, secondary cleavage sites evidently result in further degradation of the primary products (see *lane 9* in Fig. 1, and Fig. E in Supplemental Material).

To study phosphorylation of the Ca²⁺-ATPase fragments, we have adopted a moderately acidic gel electrophoresis system that previously has been described not only to retain the ability to resolve protein fragments of relatively similar molecular masses as efficiently as the Laemmli system, but also to allow phosphorylated P-type ATPases or fragments to remain phosphorylated during electrophoretic migration (5, 7). We have been able to fully confirm the value of this SDS-PAGE system. The proteolytic peptides in the PK-treated SR membranes, submitted to phosphorylation according to various protocols, followed by acid quenching and resuspension in SDS, could be clearly separated without much loss of the covalently bound ³²P (less than half of the radioactivity was lost from the phosphorylated fragments; see Fig. A in Supplemental Material) and with higher resolution than by the Weber and Osborn procedure commonly used for revealing phosphorylated P-type ATPases (data not shown). In the following, we have therefore combined the use of such Sarkadi gels with the use of various phosphorylation and dephosphorylation protocols, previously developed to study individual steps in the catalytic cycle of either SR intact Ca²⁺-ATPase or expressed wild-type or mutant ATPase (e.g. Refs. 17–19).

The p95C-p14N Complex Can Be Phosphorylated from [γ -³²P]ATP at a Relatively High Rate, but Dephosphorylates Very Slowly, Even in the Presence of ADP—Lanes 2–4 in Fig. 2A show PhosphorImager analysis of an experiment in which PK-treated SR vesicles, equilibrated in the presence of Ca²⁺, were reacted with [γ -³²P]ATP for 5, 15, or 30 s on ice before acid quenching and electrophoresis in the presence of SDS. Besides residual intact ATPase, ³²P was retained to a significant extent only by the large p95C and p83C proteolytic fragments, as expected on the basis of previous experiments performed at steady state (3, 4). The final phosphorylation levels were similar, as shown by dividing the number of picomoles of ³²P associated with each band (shown in *panel A*) by the extent of Coomassie Blue staining of the same band (shown in *panel C*), a procedure that also allowed us to take into account any small difference in the total amount of protein loaded onto each lane that could be due to a slightly variable recovery of the acid-precipitated proteins. On a time scale of a few seconds, phosphorylation of the p95C fragment on ice was fast and indistinguishable from that of either intact ATPase or p83C-p28N complex. When the exact time course of phosphorylation was resolved, using a quenched flow equipment with millisecond

time resolution at 20 °C, we found that the rate of phosphorylation of the p95C peptide was actually somewhat slower (3-fold) than that of intact ATPase (Fig. F in Supplemental Material). In separate experiments performed on ice, steady-state phosphorylation levels apparently revealed a fairly similar dependence on free Ca²⁺ for intact ATPase and the proteolytic peptides (Fig. G in Supplemental Material; see, however, below experiments designed to reveal the true affinity of the peptides for Ca²⁺ in the absence of steady-state phosphorylation). The reaction of phosphorylation from ATP in the p95C-p14N complex (the “Ca₂E1 to Ca₂E1P” transition) therefore appears not to be very different from that of intact ATPase or the p83C-p28N complex.

In contrast, after steady state was reached, EGTA-induced dephosphorylation of the p95C-p14N complex was very slow, even slower than that of the p83C-p28N complex, whose dephosphorylation is itself much slower than that of intact ATPase (as previously demonstrated in Ref. 3). This was the case both when dephosphorylation was triggered by addition of EGTA and excess non-radioactive MgATP in the presence of an ATP regenerating system (to induce dephosphorylation in the normal direction of the cycle while reducing the ADP content as much as possible, see *lanes 5–7* in Fig. 2), and when dephosphorylation was triggered by addition of EGTA and excess ADP (to assay the amount of ADP-sensitive phosphoenzyme, see *lanes 8–10* in Fig. 2). In the latter case, too, most of the p95 fragment remained phosphorylated in an unusually stable state, although most of intact ATPase and p83C had dephosphorylated within 5 s.

If interpreted within the framework of the four-step catalytic cycle generally used for intact Ca²⁺-ATPase (Ca₂E1 → Ca₂E1P → E2P → E2; see Ref. 20 and *inset* in Fig. 2), this fact suggests that for p95C the processing of phosphoenzyme from its initial ADP-sensitive form to a subsequent ADP-insensitive form remains possible (the “Ca₂E1P to E2P” transition), but hydrolysis of the ADP-insensitive form is dramatically slowed down (the “E2P to E2” step), so that at steady-state a significant proportion of the latter phosphoenzyme form accumulates. Using previously established conditions (alkaline pH and no potassium) to directly measure the rate of the transition at which phosphoenzyme becomes insensitive to ADP, i.e. is converted from Ca₂E1P to E2P (e.g. Ref. 21), we were indeed able to confirm that the latter transition is reasonably fast in p95C peptide, as it is in intact ATPase (see Fig. H, Supplemental Material).

*The p95C-p14N Complex Can Also Be Phosphorylated from [γ -³²P]P_i with Unaltered Apparent Affinity for P_i at Equilibrium, but with Kinetics Very Significantly Slowed Down for Both Phosphorylation and Dephosphorylation—To further study the properties of the ADP-insensitive form of phosphoenzyme in the p95C-p14N complex, we attempted to form it from P_i via the “backdoor” reaction, in the absence of Ca²⁺ and presence of Me₂SO (22). After equilibrium was reached, at 20 °C, the p95C peptide was found to be phosphorylated from P_i to the same extent as intact ATPase (or even to a slightly larger extent) and with essentially the same apparent affinity for P_i (*lanes 2–5* in Fig. 3A and the *left portion* of Fig. 3B), whereas phosphorylation was much less favorable for the p83C peptide, in accordance with our previous results (3). Phosphorylation from P_i was inhibited by Ca²⁺, as expected, although slightly less efficiently for the p95C peptide than for the other peptides (*lanes 5–9* in Fig. 3A and the *right portion* of Fig. 3B; a detailed discussion of this result will be given below). As P_i-derived phosphorylation of ATPase is known to be Mg²⁺-dependent (possibly because Mg-P_i is the real substrate, see Ref. 6), we also checked the effect of increasing concentrations of Mg²⁺ (see Fig. I in Supplemental Material) and again found no obvious difference in*

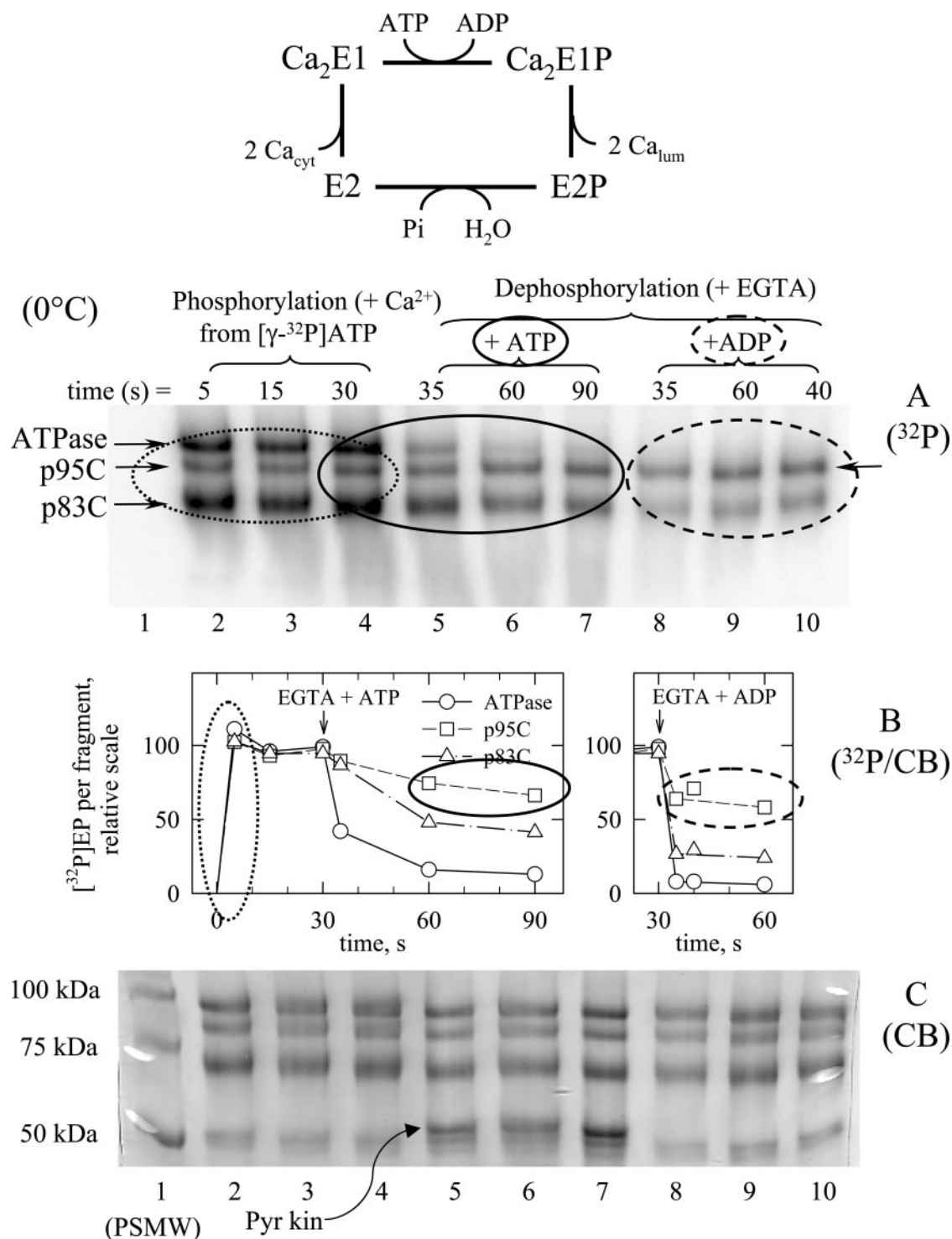


FIG. 2. After rapid phosphorylation to steady-state (from [γ -³²P]ATP), the p95C-p14N complex dephosphorylates very slowly, even in the presence of ADP. PK-treated membranes were, after proteolysis arrest, supplemented with 0.55 mM Ca²⁺ and phosphorylation was then triggered by diluting these membranes to 0.2 mg/ml protein into a phosphorylation medium, on ice, consisting of buffer A supplemented with 5 μ M [γ -³²P]ATP, 100 μ M Ca²⁺, and 50 μ M EGTA. Membranes were phosphorylated for 5, 15, or 30 s (lanes 2–4). After phosphorylation for 30 s, dephosphorylation of the various fragments was either triggered by addition of 2 mM EGTA, 2 mM MgATP, 1 mM phosphoenol pyruvate, and 0.02 mg/ml pyruvate kinase (to remove ADP as much as possible) and monitored after 5, 30, or 60 s (lanes 5–7), or triggered by addition of EGTA together with 1 mM ADP and again monitored after 5, 30, or 10 s (by mistake) (lanes 8–10). lane 1 contained prestained molecular weight markers (PSMW). Panel A shows the PhosphorImager scan of the gel. From this scan and from the Coomassie Blue staining ability of the various bands (panel C), we computed the relative ability of the various bands to retain ³²P (panel B), taking the phosphorylation level of intact ATPase at 30 s as 100%.

the apparent affinity of p95C-p14N and intact ATPase for Mg²⁺ concerning P_i-derived phosphorylation at equilibrium (despite a reduced apparent affinity for vanadate; this will be further discussed below).

Ca²⁺-independent phosphorylation from P_i in the presence of

Me₂SO was also measured on ice. In this case, phosphorylation of p95C again proved possible, up to quite high a final phosphorylation level (whereas phosphorylation of p83C was very faint). But the rate of p95C phosphorylation from P_i was much slower than for intact ATPase (lanes 1–4 in Fig. 4). After half

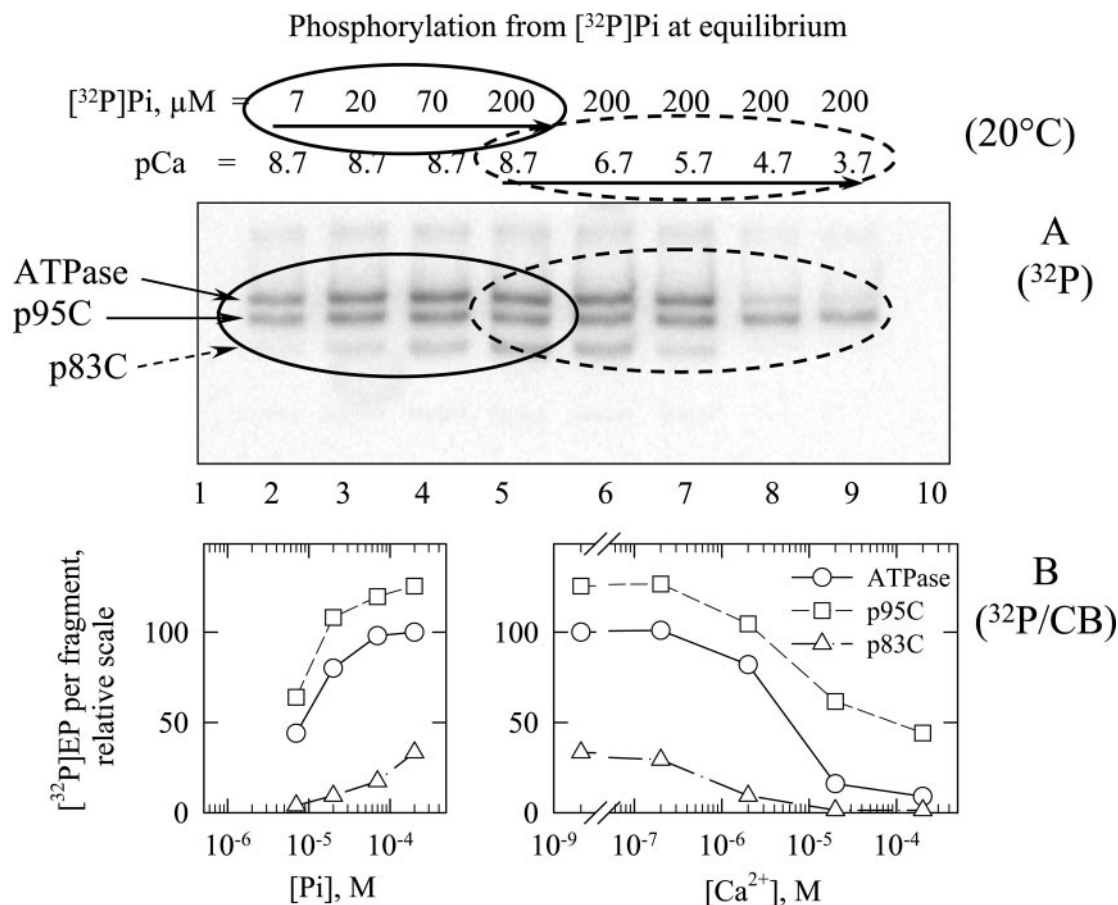


FIG. 3. Phosphorylation from [³²P]P_i of the p95C-p14N complex occurs with quasi-normal affinity for P_i, and inhibition by Ca²⁺ is slightly less pronounced. PK-treated and resuspended membranes were incubated for 15 min in buffer B supplemented with 25% Me₂SO and either 1 mM EGTA and various concentrations of [³²P]P_i (lanes 2–5), or 200 μM [³²P]P_i and various concentrations of free Ca²⁺ (resulting in the pCa indicated, lanes 5–9). Lanes 1 and 10 contained molecular mass markers (“low molecular weight,” LMW). Panel A shows the PhosphorImager scan. From this scan and from the Coomassie Blue staining ability of the various bands (not shown), we computed the relative ability of the various bands to retain ³²P (panel B), taking the phosphorylation level of intact ATPase at pCa 8.7 and 200 μM P_i as 100%.

an hour of phosphorylation under these conditions, dephosphorylation was triggered by a 10-fold dilution of the phosphorylated membranes into a Me₂SO-free and KCl- and ATP-containing medium similar to that previously used to measure dephosphorylation after ATP-dependent phosphorylation. Although intact ATPase dephosphorylated very rapidly (as expected), this was not the case for p95C, which remained unusually stable. This fully confirms that the slow dephosphorylation rate and reduced ADP sensitivity inferred from the ATP phosphorylation experiment in Fig. 2 above are mainly due to a severe slowing down of the “E2P to E2” transition in the p95C-p14N complex. At 20 °C, we also observed both a slowing down of the phosphorylation rate (from P_i) and a slowing down of the dephosphorylation rate of p95C (here, after addition of excess non-radioactive P_i in the continued presence of Me₂SO), compared with intact ATPase (see Fig. J in Supplemental Material). The reduction of both phosphorylation and dephosphorylation rates is consistent with the similar apparent affinities found at equilibrium for p95C-p14N and for intact ATPase (lanes 2–5 in Fig. 3 above). Thus, after ATPase cleavage at Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰, the P_i-derived phosphorylated form of the p95C-p14N complex is neither stabilized nor destabilized relative to the unphosphorylated form, but the kinetics of the phosphorylation/dephosphorylation reactions are slowed down, i.e. the energy barrier for the reaction is higher.

The Unphosphorylated p95C-p14N Complex Has a Poorer Affinity for Ca²⁺ and a Reduced Rate of Reaction with Ca²⁺,

Compared with Intact ATPase—The unaltered affinity with which the p95C-p14N complexes can be phosphorylated from P_i makes it possible to interpret in more detail the apparent competition, at equilibrium, between Ca²⁺ binding and phosphorylation from P_i illustrated in lanes 5–9 of the preceding Fig. 3. It is well known that, in such experiments, the efficiency of Ca²⁺ for preventing phosphorylation from P_i depends on both the true affinity of the ATPase for Ca²⁺ and the equilibrium prevailing between phosphorylated and non-phosphorylated forms of Ca²⁺-free ATPase. Thus, the fact that the EC₅₀ of Ca²⁺ for inhibiting phosphorylation from P_i of intact ATPase was about 6 μM, i.e. somewhat higher than the Ca_{1/2} for equilibrium binding of Ca²⁺ at pH 7 in the absence or presence of Me₂SO (e.g. Ref. 6), is consistent with the fact that, in the presence of 200 μM P_i and Me₂SO, phosphorylation from P_i efficiently reduces the amount of Ca²⁺-free ATPase available for reaction with Ca²⁺. Similarly, the fact that for the p83C peptide the EC₅₀ for inhibition by Ca²⁺ was now less than 1 μM is consistent with the above-mentioned unfavorable phosphorylation of this peptide from P_i and the unaltered true affinity of this peptide for Ca²⁺ (3). On these grounds, because intact ATPase and the p95C-p14N complex are phosphorylated with roughly the same apparent affinity for P_i, the fact that phosphorylation of the p95C peptide was reduced by half only at about 20 μM Ca²⁺ (pCa 4.7) suggests that this peptide has experienced a true loss in affinity for Ca²⁺.

To investigate the kinetics of the Ca²⁺-dependent transition from E2 to Ca₂E1, we then turned back to Ca²⁺-dependent

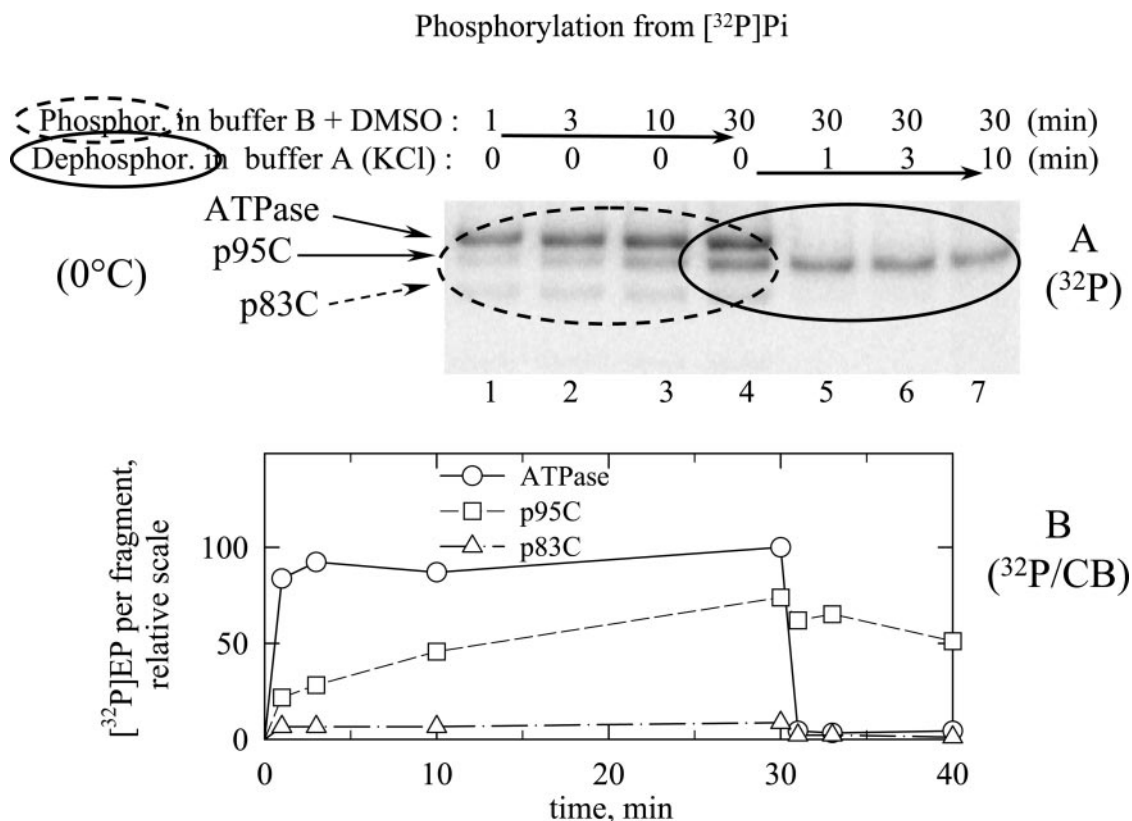


FIG. 4. In the p95C-p14N complex, dephosphorylation of E2P, formed from [³²P]P_i, is indeed slowed down compared with intact ATPase, and the (reverse) rate of phosphorylation is also slowed down. PK-treated and resuspended membranes were reacted with 200 μM [³²P]P_i in buffer B supplemented with 25% Me₂SO and 1 mM EGTA, on ice, and the kinetics of phosphorylation of the various bands was first measured (lanes 1–4). After 30-min phosphorylation, dephosphorylation was triggered by 10-fold dilution into Me₂SO-free buffer A, supplemented with 2 mM MgATP and 1 mM EGTA (similar results were obtained if excess non-radioactive P_i was also present, data not shown), and monitored for a few more minutes (lanes 4–7). Panel A shows the PhosphorImager scan. From this scan and from the Coomassie Blue staining ability of the various bands (not shown), we computed the relative ability of the various bands to retain ³²P (panel B), taking the phosphorylation level of intact ATPase after 30 min at 20 °C as 100%.

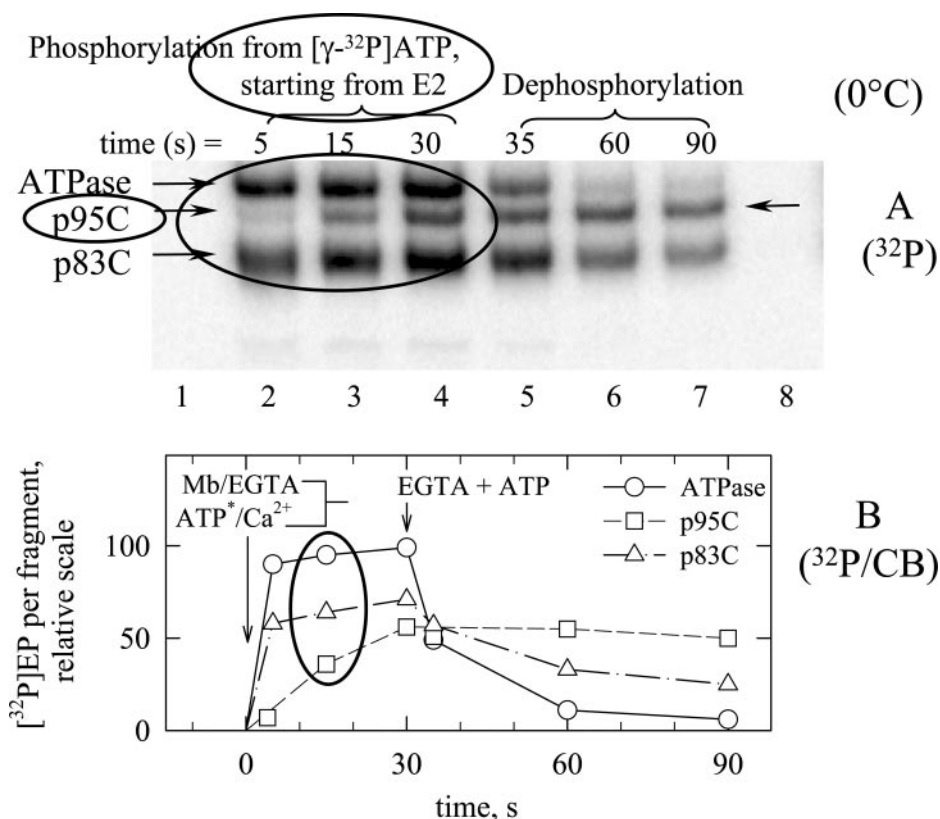
phosphorylation from [³²P]ATP. We designed an experiment, on ice, similar to the one illustrated in Fig. 2 except that before being added to the phosphorylation medium (which contained [³²P]ATP together with an excess of Ca²⁺), PK-treated membranes were now left in the presence of EGTA, to allow Ca²⁺-free fragments to react with Ca²⁺ and ATP at the same time (Fig. 5). Phosphorylation of p95C was definitely slower under these conditions (compare with the results in lanes 2–4 in Fig. 2), and much slower than phosphorylation of p83C or intact ATPase. This indicates that in the p95C-p14N complex the calcium-induced transition from the Ca²⁺-free form to the Ca²⁺-bound and phosphorylatable form is relatively slow. The same fact was observable when experiments were repeated at 20 °C with a rapid mixing and quenching machine (see Fig. K in Supplemental Material).

This slow transition allowed us to design a protocol for estimating by a phosphorylation assay the “true” affinity of Ca²⁺ binding to p95C. In this experiment, PK-treated fragments were pre-equilibrated at various *p*Ca values, and we measured then the amount of phosphorylated p95C formed after only 5-s incubation with [³²P]ATP, anticipating from the results in Fig. 5 that fragments of p95C phosphorylated after this reaction period would correspond to those ATPase fragments that already had Ca²⁺ bound to them at time zero (because Ca²⁺-free p95C fragments are unable to react with ATP within such a short period). Fig. L in the Supplemental Material shows that the Ca_{1/2} for EP formation by the p95C-p14N complex after only 5s was between 2 and 20 μM, *i.e.* higher than what is known from literature for intact SR or p83C under the same conditions (*e.g.* Ref. 3) and in fact also found in this experiment. This

finding therefore confirms the above conclusion that the true affinity for Ca²⁺ of the p95C-p14N complex is slightly reduced, relative to that of intact ATPase. Note that when EP measurements were performed after phosphorylation for 30 s instead of only 5 s, the difference between Ca_{1/2} values for the p95C-p14N complex and intact ATPase was not as pronounced, as previously mentioned (see Fig. G in Supplemental Material), presumably because in a steady-state situation the strong inhibition of dephosphorylation in the p95C-p14N complex compensates for the loss in true calcium affinity (see, for instance, a related discussion about the effects of steady-state cycling in Ref. 23).

The “True” Affinity with Which Ca²⁺-free Unphosphorylated p95C-p14N Complex Binds Orthovanadate Tightly Is Poorer Than That of Intact ATPase—The small shift of the equilibrium affinity for Ca²⁺ suggested by both Figs. 3 and Fig. L, combined with the much more pronounced slowing down of the Ca²⁺-induced transition shown in Fig. 5 (and Fig. K), might suggest that the (reverse) events accompanying Ca²⁺ dissociation from the p95C-p14N complex are also slightly slowed down, although not to the same extent as the Ca²⁺-induced transition. We did not check this directly. Something we did check, however, is the above suggestion, deduced from the kinetic and equilibrium characteristics of the P_i-derived phosphorylation of the p95C-p14N complex, that the energy barrier for phosphorylation of this complex from P_i is higher than for intact ATPase. Such a relative destabilization of the transition state for the phosphorylation/dephosphorylation reactions was established in experiments in which we measured the true affinity with which this complex can bind orthovanadate,

FIG. 5. Phosphorylation from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ of the p95C-p14N complex is slow when the complex initially is in a Ca^{2+} -deprived state, suggesting a slow E2 to $\text{Ca}_2\text{E1}$ transition. Here, in contrast with the experiments illustrated in Fig. 2, PK-treated membranes were left in EGTA (0.5 mM) after proteolysis arrest, and phosphorylation was triggered by 10-fold dilution of these membranes into a $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -containing phosphorylation medium that had been supplemented with 100 μM total Ca^{2+} . Phosphorylation was measured after various periods (lanes 2–4). Dephosphorylation after 30-s phosphorylation was also measured in the same experiment (lanes 5–7), as a repetition of the dephosphorylation experiment previously illustrated in lanes 5–7 of Fig. 2 (and with similar results). Lanes 1 and 8 contained molecular mass markers (LMW and PSMW, respectively). Panel A shows the PhosphorImager scan. From this scan and from the Coomassie Blue staining (not shown), we computed the relative ability of the various bands to retain ^{32}P (panel B), taking the phosphorylation level of intact ATPase at 30 s as 100%. Circles: intact ATPase; squares, p95C peptide; triangles, p83C peptide.



whose binding is generally considered to provide an analog of the transition state formed during phosphorylation from P_i . The rationale of such experiments (24–26) is to incubate the membranes with vanadate for an extended period of time (to attain equilibrium) and, subsequently, to phosphorylate the sample from ATP for a short period of time and thereby measure the amount of ATPase that has not reacted with vanadate. Care was taken, on the one hand, to keep the phosphorylation reaction period short enough to minimize dissociation of previously formed ATPase-vanadate complexes, and, on the other, to make it long enough to ensure full phosphorylation of all vanadate-free ATPase fragments. Such experiments, performed with PK-treated SR membranes, showed that after 1-h incubation at 20 °C, vanadate bound to intact ATPase with the expected sub-micromolar affinity, whereas the apparent affinity of the p95C-p14N complex for vanadate was shifted to higher concentrations by more than one order of magnitude (Fig. 6). If, after preincubation with vanadate, the phosphorylation period was increased, the amount of phosphorylated p95C became larger on a relative basis (*i.e.* compared with phosphorylated intact ATPase), suggesting for vanadate bound to p95C-p14N a faster rate of dissociation which fits with poorer binding. Using this assay, the p83C-p28N complex was found completely unable to bind orthovanadate tightly, as previously found (3) and attributed to a deficient “E2” conformation.

DISCUSSION

Methodology—The present data demonstrate the usefulness of combining phosphorylation protocols with an appropriate gel electrophoretic separation technique, to study the partial reactions of various Ca^{2+} -ATPase proteolytic fragments, even when only small relative amounts of these fragments are formed along with other cleavage products. Such a combination might also prove useful for the study of other P-type ATPases. For one of the Ca^{2+} -ATPase complexes resulting from treatment with proteinase K, p83C-p28N, formed after cleavage at Glu²⁴³, the results we obtained with the present combination of techniques

are in agreement with those that we had obtained earlier by other, more standardized techniques (Refs. 3 and 27; see additional discussion about the p83C peptide in the Supplemental Material). This gives credit to the results obtained here concerning the p95C-p14N complex, resulting from cleavage at Lys¹²⁰, which will be discussed more specifically.

The Main Effects of Cleavage at Lys¹²⁰—We found that disruption of the link between the A-domain and the second transmembrane span by cleavage of the Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰ peptide bond gives rise to a pronounced decrease in the ATPase activity of SERCA1a, yet with retention of the capacity for almost full phosphorylation from ATP and P_i . The detailed analysis of the properties of the resulting p95C-p14N complex indicates that the reaction rates associated with E2P dephosphorylation or formation of E2P from E2 and P_i are both reduced by at least two orders of magnitude, without appreciably affecting the equilibrium constant of the reaction. In comparison, the rate for the E2 → $\text{Ca}_2\text{E1}$ transition is reduced less strongly, whereas phosphorylation of $\text{Ca}_2\text{E1}$ from ATP and the subsequent $\text{Ca}_2\text{E1P}$ → E2P transition are affected to an even lesser extent. This pattern differs significantly from the pattern found for the previously studied N-terminal proteinase K cleavage product, the p83C-p28N complex, in which the link between the A-domain and M3 (the third membrane span) has been disrupted by excision of the short ²³⁹MAATE²⁴³ sequence (3): in that case proteinase K cleavage primarily results in severe reduction of the Ca^{2+} translocating $\text{Ca}_2\text{E1P}$ → E2P transition and an impaired capability to form E2P from P_i in the absence of Ca^{2+} . To facilitate discussion, Fig. 7 summarizes the effects on the various transition rates that we have observed in the present work to result from ATPase cleavage at either Lys¹²⁰ or Glu²⁴³ (this work and Ref. 3) (the numbers in Fig. 7 should nevertheless be regarded as a crude summary only, because data obtained under different conditions have been pooled together).

The A-domain, a Phosphatase Domain?—A few years ago, the mutation of some of the transmembrane residues critical

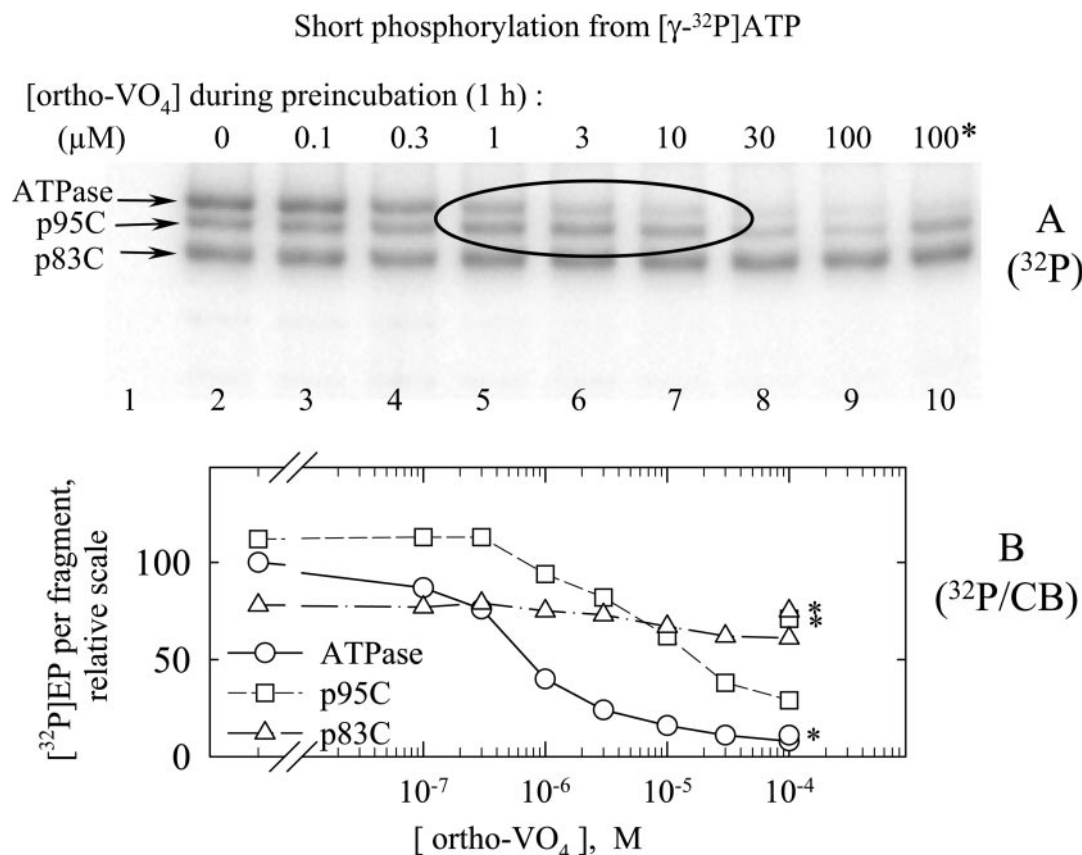


FIG. 6. The true affinity with which orthovanadate binds to Ca²⁺-free p95C-p14N complex and inhibits its phosphorylation from [γ -³²P]ATP is clearly poorer than for intact ATPase. PK-treated membranes were diluted to 0.1 mg/ml protein in buffer A (100 mM KCl, 5 mM Mg²⁺, and 50 mM Mops-Tris at pH 7.0) supplemented with 0.2 mM EGTA, and incubated for 65 min at 20 °C with various concentrations of orthovanadate. Samples were subsequently cooled on ice for 10 min, and phosphorylation was triggered by the simultaneous addition of 5 μM [γ -³²P]ATP and 300 μM Ca²⁺. Acid quenching was performed after 30-s phosphorylation (120 s in the sample indicated by an asterisk, lane 10). Panel A shows the PhosphorImager scan. From this scan and from the Coomassie Blue staining ability of the various bands (not shown), we computed the relative ability of the various bands to retain ³²P (as in Fig. 2B), taking the maximal phosphorylation level of the intact ATPase band (in the absence of vanadate, lane 1) as 100% (panel B). Note that if the phosphorylation period was increased from 30 to 120 s (lane 10), the amount of phosphorylated p95C became larger, consistent with a relatively fast rate of dissociation for vanadate bound to p95C-p14N.

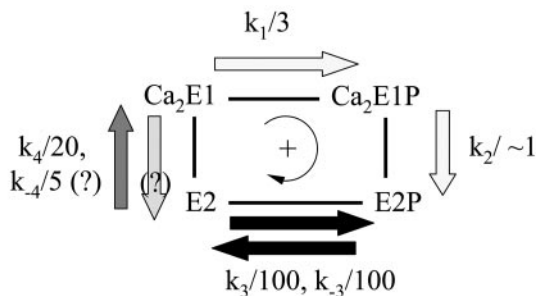
for Ca²⁺ binding was also found to result in reduced rates of E2P dephosphorylation (reviewed in Ref. 28). However, these mutants generally had apparent affinities for P_i higher than normal, and therefore defective proton binding to the counter-transport sites was suspected to be responsible for their reduced rates of dephosphorylation. Subsequently, mutation of Arg¹⁹⁸ in the A-domain was found to moderately reduce the rate of dephosphorylation (29), and more recently, a dramatically reduced rate of E2P dephosphorylation was observed for many mutants of Val²⁰⁰ near the T2 site in the A-domain of Ca²⁺-ATPase (30). This is also the case for a mutant of Glu¹⁸³ in the conserved TGES sequence of the A-domain,² and a closely related situation has been described to occur after mutation of Thr²¹⁴ in the conserved TGES sequence of the A-domain of Na⁺,K⁺-ATPase, where a 5-fold reduction of the dephosphorylation rate was found for the Thr²¹⁴ → Ala mutant (25). Independently, it has been suggested for Na⁺,K⁺-ATPase (32, 33) and H⁺,K⁺-ATPase (34) that the glutamate residue of the TGES motif in the A-domain may be interacting with the phosphorylation site through the Mg²⁺ residue bound to the phosphorylated Asp³⁵¹ residue in the catalytic site (this conclusion was derived from cleavage experiments performed in the presence of hydrogen peroxide and ferrous ion, with Fe·ATP presumably acting as a substitute for Mg·ATP in the catalytic site). Thus, it is likely that the A-domain in general, and the

TGES motif in particular, play a specific role in acid/base catalyzed cleavage of the aspartylphosphate bond at Asp³⁵¹ in E2P (an effect that may be enhanced if the cavity formed by the regions of the P-domain and A-domain which surround the catalytic site in the E2P state is fairly hydrophobic, see Ref. 22). Our present demonstration of a dramatic inhibition, after cleavage at Lys¹²⁰ of the link between M2 and the A-domain, fits well into this picture of the role of the A-domain. All these results revive a concept, previously proposed for H⁺-ATPases, of the A-domain being a "phosphatase" domain, acting at a late step of the cycle (35–37), whereas the N-domain would act as a "kinase" domain in an early step of the ATPase cycle. As discussed by Toustrup-Jensen and Vilsen (25), this would also fit with the demonstrated existence, in non-ATPase members of the HAD family, of catalytic residues *outside* the Rossman fold (corresponding to the ATPase P-domain), to assist the nucleophilic attack of water during dephosphorylation.

Structural Implications of the Effect of Proteolysis—From a structural point of view, it seems clear that the movements of the A-domain are key events for active transport (31). For instance, extensive rotation parallel to the membrane accompanies the ATPase transition from its Ca²⁺-bound E1 conformation to its Ca²⁺-free conformations, either stabilized by TG or, for two-dimensional membrane crystals, in the additional presence of decavanadate (2, 15, 38; PDB accession numbers 1EUL, 1IWO, and, for the modeled structures, 1FQU and 1KJU); this rotation is probably an essential element for the

² J. P. Andersen and J. D. Clausen, personal communication.

p95C/p14N versus intact ATPase :



p83C/p28N versus intact ATPase :

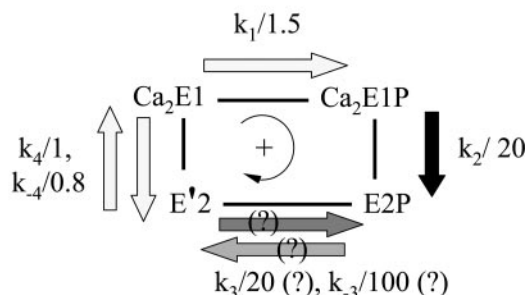


FIG. 7. Summary of the functional effects of ATPase cleavage at either Lys¹²⁰ or Glu²⁴³. Numbers given here are only very tentative figures, obtained by pooling for each transition the numbers obtained under different experimental conditions (temperature, Me₂SO, etc.). As concerns the p83C-p28N complex, the reduced rates indicated for phosphorylation from P_i and dephosphorylation of E2P are also somewhat tentative; they are based on the results in Fig. 2 and Fig. J of Supplemental Material (see also additional discussion about the phosphorylation properties of the p83C peptide in Supplemental Material). The unphosphorylated Ca²⁺-free form of this complex was dubbed "E'2" to emphasize the uncertainty about the real structure of this intermediate (3).

interaction of the A-domain with the P-domain and concomitant positioning of the TGES sequence in the vicinity of the catalytic site. The S2 and S3 ATPase segments linking the cytosolic A-domain to the transmembrane region and containing the proteinase K cleavage sites (Lys¹²⁰ and Glu²⁴³) could conceivably play a strategic role in this rotation, because the 11WO Ca²⁺-free structure shows that after rotation these segments interact with helices P6 and P7 of the P-domain (Fig. 8). Nevertheless, the fact that the p95C-p14N complex remains capable of being phosphorylated from P_i (at a slow rate, but with an unaltered apparent affinity for P_i) implies that E2 and E2P conformations with a rotated A-domain can still be formed after cleavage of S2. In fact, some of our results with the p95C-p14N complex (the decreased affinity for Ca²⁺, the slower E2 to Ca₂E1 transition, and the accumulation of E2P during turnover) might even be interpreted as suggesting that both the E2 and E2P conformations are slightly stabilized in the proteolyzed complex (relative to the Ca²⁺-bound conformation), as if cleavage at Lys¹²⁰ does not prevent, but even favors stable reorientation of the A-domain (in contrast with cleavage at Glu²⁴³, see Ref. 3).

Thus, in continuation of the above considerations we still need to address the most remarkable effect of proteolytic cleavage of S2, *i.e.* the dramatic slowing down of the rates of phosphorylation from P_i and of dephosphorylation, an effect likely to reflect perturbation of the pathway through which A- and P-domains can change their mutual interactions during the enzymatic cycle. Of course, this perturbation may stem in part from entropic effects, because new conformations made avail-

able (at least locally) by the chain disruption may reduce the probability for proceeding along the normal reaction pathway. But in addition, as previously discussed in connection with similar effects observed for some mutants (25, 39), the fact that in the p95C-p14N complex both forward and reverse rates of backdoor phosphorylation from P_i are apparently reduced to the same extent may imply relative destabilization of the *transition state* for the phosphorylation reaction. In support of this view we indeed observed a reduction in the affinity with which the p95C-p14N complex binds orthovanadate, a ligand that is considered as an analog of the pentacoordinated transition state of the phosphoryl group (40).

It is difficult at present to discuss the structural basis for this observation, because we do not have any high resolution structure of this transition state at our disposal. However, by fitting the E1 high resolution three-dimensional structure into low density maps of two-dimensional membrane crystals, two models have been proposed for decavanadate-reacted Ca²⁺-ATPase (Protein Data Bank accession codes 1FQU (1) and 1KJU (38)), an ATPase form that probably also contains orthovanadate and may therefore provide the best presently available approximation of the transition state of the protein during dephosphorylation. Judging from these structures, it is not impossible that part of the explanation for the effect of cleavage at Lys¹²⁰ may indeed be that cleavage prevents the formation of bonds essential for attaining the transition state (see additional discussion in the Supplemental Material). In this respect, it is remarkable that results very recently obtained by directed mutagenesis confirmed the prominent role for the E2P to E2 transition (and the more modest role for the E2 to Ca₂E1 transition) of residue Tyr¹²² (and also, to a lesser extent, of residue Glu¹²³), immediately above the Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰ bond disrupted by our PK treatment (41).

As indicated in Fig. 7, cleavage of Ca²⁺-ATPase at Glu²⁴³ in the segment linking the A-domain and S3 gives rise to a different phenotype for the resulting p83C-p28N complex, where the Ca₂E1P to E2P transition and the E2P dephosphorylation are both strongly inhibited. In the case of this complex, we could measure inhibition of Ca²⁺ transport, too (3), whereas in the case of the p95C-p14N complex, we have no evidence at present that the disrupted S2 link has any specific effect on translocation (beyond the expected slowing down of activity). However, it remains a tempting idea that in addition to locally changing the A/P interactions, disruption of the various loops between the A-domain and the transmembrane region prevents mechanical forces to be transmitted from the catalytic domains to the transport sites and vice versa. Together with the links through S2 and S3, the link through S1 will obviously also play a major role in these events, because it has been beautifully demonstrated recently that single deletion of any of the residues in the Glu⁴⁰-Ser⁴⁸ loop between M1 and the A-domain slows down both the Ca₂E1P to E2P transition and the E2P to E2 transition (Ref. 51; see also Supplemental Material). If movement of the A-domain (parallel and perpendicular to the membrane plane) leads to both phosphoenzyme hydrolysis and ion occlusion or deocclusion, this could perhaps justify revival of the old name of "transduction domain" that was once given to the A-domain, although on the basis of controversial experiments (42–44). The segments that have been proteolyzed in the present work could be among the controlling elements that coordinate events at the cytosolic catalytic site with events at the membranous transport sites, as requested by the "coupling rules" of active transport (45).

Acknowledgments—We thank Pr. Robin Post for suggesting us to try and measure the effect of cleaving the ATPase at Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰, as well as for helpful comments on our draft. We also thank J. P. Andersen and

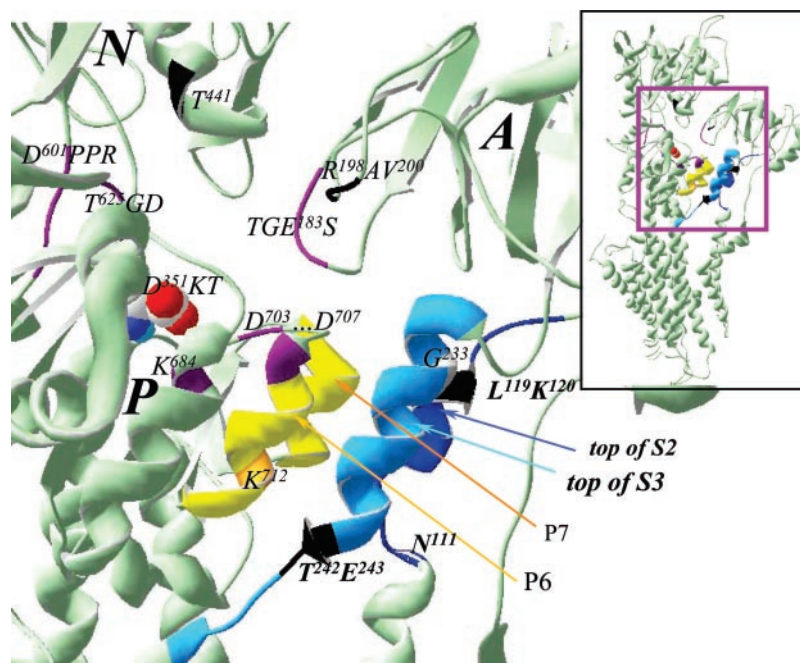


FIG. 8. **Interface between A- and P-domains (S2/S3 and P6/P7) in the Ca²⁺-free form of Ca²⁺-ATPase.** This representation is based on the structure whose Protein Data Bank accession code is 1IWO (including indications therein concerning the limits of the various secondary structures). In this structure, the top portions of S2 and S3 (dark blue and light blue, respectively) are facing the P7 and P6 helices, respectively (the latter helices are colored yellow); P6 is the helix at the beginning of which Asp⁷⁰⁷, one of the residues conserved in all members of the whole HAD family, sits. In addition to the S2/S3-P6/P7 interface (amino acids 111–124 are colored dark blue, and 230–247 are colored light blue), residues of special interest are also indicated, especially conserved ones. Note that mutation of Gly²³³ and cleavage at Glu²³¹ (references in Ref. 3) on S3, at the same level as the top of P6, as well as mutation of Asn¹¹¹ (see Ref. 47) on S2, below Lys¹²⁰, are critical for ATPase function, as well as mutation of Tyr¹²² and Glu¹²³ on S2, just above Lys¹²⁰ (see Ref. 51) (see also Fig. M in Supplemental Material).

J. D. Clausen for communicating to us the results of their unpublished experiments with ATPase mutants and for extensive discussion, as well as for tips on how to make phosphoenzyme measurements more reproducible, Bitten Holm for her assistance in some of these experiments, Paulette Decottignies-Le Maréchal (Université Paris XI, Orsay) for her help with N-terminal sequencing, and Chikashi Toyoshima for discussion.

REFERENCES

- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000) *Nature* **405**, 647–655
- Toyoshima, C., and Nomura, H. (2002) *Nature* **418**, 605–611
- Møller, J. V., Lenoir, G., Marchand, C., Montigny, C., le Maire, M., Toyoshima, C., Juul, B. S., and Champeil, P. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 38647–38659
- Juul, B., Turc, H., Durand, M. L., Gomez de Gracia, A., Denoroy, L., Møller, J. V., Champeil, P., and le Maire, M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 20123–20134
- Sarkadi, B., Enyedi, A., Földes-Papp, Z., and Gárdos, G. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 9552–9557
- Champeil, P., Guillain, F., Vénien, C., and Gingold, M. P. (1985) *Biochemistry* **24**, 69–81
- Sarkadi, B., Enyedi, A., Penniston, J. T., Verma, A. K., Dux, L., Molnár, E., and Gárdos, G. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **939**, 40–46
- Menguy, T., Corre, F., Bouneau, L., Deschamps, S., Møller, J. V., Champeil, P., le Maire, M., and Falson, P. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 20134–20143
- Tsvikovskii, R., Eisses, J. F., Kaplan, J. H., and Lutsenko, S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 976–983
- Echarte, M. M., Levi, V., Villamil, A. M., Rossi, R. C., and Rossi, J. P. (2001) *Anal. Biochem.* **289**, 267–273
- Champeil, P., Menguy, T., Tribet, C., Popot, J. L., and le Maire, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18623–18637
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) *Anal. Chem.* **68**, 850–858
- Guex, N., and Peitsch, M. C. (1997) *Electrophoresis* **18**, 2714–2723
- Champeil, P., Menguy, T., Soulié, S., Juul, B., Gomez de Gracia, A., Rusconi, F., Falson, P., Denoroy, L., Henao, F., le Maire, M., and Møller, J. V. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 6619–6631
- Danko, S., Daiho, T., Yamasaki, K., Kamidochi, M., Suzuki, H., and Toyoshima, C. (2001) *FEBS Lett.* **489**, 277–282
- Tong, S. W. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**, 1242–1248
- Clarke, D. M., Loo, T. W., Inesi, G., and MacLennan, D. H. (1989) *Nature* **339**, 476–478
- Andersen, J. P., and Vilsen, B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 19383–19387
- Sørensen, T. L., Vilsen, B., and Andersen, J. P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30244–30253
- Makinose, M. (1973) *FEBS Lett.* **37**, 140–143
- Vilsen, B., Andersen, J. P., Clarke, D. M., and MacLennan, D. H. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 21024–21030
- de Meis, L., Martins, O. B., and Alves, E. W. (1980) *Biochemistry* **19**, 4252–4261
- Andersen, J. P., Sørensen, T. L., Povlsen, K., and Vilsen, B. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 23312–23321
- Medda, P., and Hasselbach, W. (1983) *Eur. J. Biochem.* **137**, 7–14
- Toustrup-Jensen, M., and Vilsen, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 11402–11410
- Clausen, J. D., and Andersen, J. P. (2003) *Biochemistry* **42**, 2585–2594
- Møller, J. V., Lenoir, G., le Maire, M., Juul, B. S., and Champeil, P. (2003) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **986**, 82–89
- Andersen, J. P. (1995) *Biosci. Rep.* **15**, 243–261
- Daiho, T., Suzuki, H., Yamasaki, K., Saino, T., and Kanazawa, T. (1999) *FEBS Lett.* **444**, 54–58
- Kato, S., Kamidochi, M., Daiho, T., Yamasaki, K., Gouli, W., and Suzuki, H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 9624–9629
- Toyoshima, C., Nomura, H., and Sugita, Y. (2003) *FEBS Lett.* **555**, 106–110
- Goldshleger, R., and Karlsh, S. J. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 16213–16221
- Patchornik, G., Goldshleger, R., and Karlsh, S. J. D. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 11954–11959
- Shin, J. M., Goldshleger, R., Munson, K. B., Sachs, G., and Karlsh, S. J. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 48440–48450
- Serrano, R. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **947**, 1–28
- Portillo, F., and Serrano, R. (1988) *EMBO J.* **7**, 1793–1798
- Portillo, F., Eraso, P., and Serrano, R. (1996) in *Biomembranes, ATPases* (Lee, A. G., ed) Vol. 5, pp. 225–240, JAI Press, Greenwich, CT
- Xu, C., Rice, W. J., He, W., and Stokes, D. L. (2002) *J. Mol. Biol.* **316**, 201–211
- Andersen, J. P., and Vilsen, B. (1993) *Biochemistry* **32**, 10015–10020
- Cantley, L. C., Jr., Cantley, L. G., and Josephson, L. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 7361–7368
- Yamasaki, K., Daiho, T., Danko, S., and Suzuki, H. (2003) *J. Biol. Chem.* **279**, 2202–2210
- Scott, T. L., and Shamoo, A. E. (1982) *J. Membr. Biol.* **64**, 137–144
- Torok, K., Trinnaman, B. J., and Green, N. M. (1988) *Eur. J. Biochem.* **173**, 361–367
- Shoshan-Barmatz V., Ouziel, N., and Chipman, D. M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 11559–11564
- Jencks, W. P. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 18855–18858
- Soulié, S., Møller, J. V., Falson, P., and le Maire, M. (1996) *Anal. Biochem.* **236**, 363–364
- MacLennan, D. H., Clarke, D. M., Loo, T. W., and Skerjanc, I. S. (1992) *Acta Physiol. Scand.* **146**, 141–150
- Henao, F., de Foresta, B., Orlowski, S., Cuenda, A., Gutiérrez-Merino, C., and Champeil, P. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202**, 559–567
- Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., Suzuki, H., and Toyoshima, C. (2001b) *FEBS Lett.* **505**, 129–135
- Ma, H., Inesi, G., and Toyoshima, C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 28938–28943
- Daiho, T., Yamasaki, K., Wang, G., Danko, S., Iizuka, H., and Suzuki, H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 39197–39204

SUPPLEMENTAL MATERIAL for the manuscript by

Guillaume Lenoir, Martin Picard, Carole Gauron, Cédric Montigny, Pierre Le Maréchal,
Pierre Falson, Marc le Maire, Jesper V. Møller and Philippe Champeil

**“Functional properties of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase
after proteolytic cleavage at Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰, close to the A-domain”.****METHODS: further details.**

Proteolysis by proteinase K (PK). To prepare a large batch of PK-treated concentrated membranes, 9 ml of PK-treated membranes at 2 mg protein/ml was treated with PK and PMSF as described under Methods, and then pelleted (after adding 0.3 M sucrose, 20 mM Tes-Tris at pH 7.5 and 0.6 mM Ca^{2+} , to protect the ATPase from EGTA-dependent denaturation during centrifugation). Membranes were then resuspended at about 20 mg/ml protein (judging from $\text{OD}_{280\text{nm}}$ of an aliquot solubilized in SDS) in 0.3 M sucrose, 100 mM KCl and 20 mM Tes-Tris (pH 7.5), before freezing in liquid nitrogen and storage at -80°C until subsequent use. When SR vesicles were treated this way, SDS-PAGE revealed essentially the same pattern as shown in lane 8 of Fig 1, except that in this case, of course, the soluble p29/30 fragments were absent from the resuspended pellet (data not shown).

Electrophoretic separation and autoradiography. Recovery on the gel of the ^{32}P initially bound covalently to the fragments was evaluated either from PhosphorImager direct counting of a similar aliquot of the resuspended pellet (without electrophoresis, not shown), or from parallel experiments with intact SR ATPase whose phosphorylation level can be independently measured by direct filtration. At least in our hands, electrophoretic separation according to Sarkadi was faster and provided higher resolution than separation according to Weber and Osborn (data not shown).

Time resolved phosphorylation measurements on the millisecond time scale. These measurements were made at 20°C with a Biologic rapid mixing and quenching equipment (QFM5) (e.g. ref. 48).

Conditions for separation of proteolytic fragments and yet retention of phosphorylation

In some cases, phosphorylated samples were submitted to SDS-PAGE simultaneously in a Laemmli-type system (4) and in a Sarkadi-type system, in order to compare the efficiency of the two systems for separation of phosphorylated fragments and ^{32}P recovery after electrophoretic migration. *Figure A* below shows that the large C-terminal fragments obtained after Ca^{2+} -ATPase treatment with PK can indeed be clearly separated by Sarkadi gels, just as well as by Laemmli gels. The Sarkadi gels can be run either in the cold room or at 20°C , but ^{32}P recovery is higher after electrophoresis in the cold room.

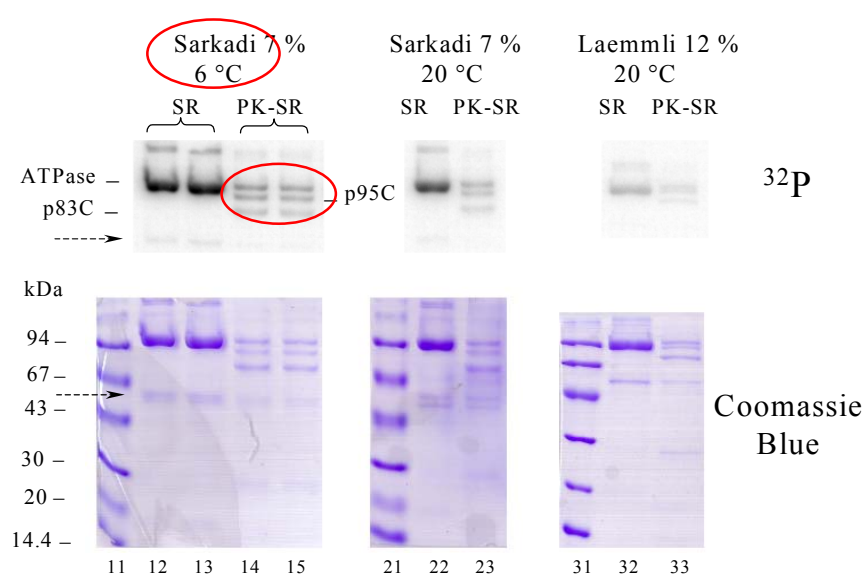


Figure A. Conditions for separation of proteolytic fragments and yet retention of phosphorylation.

SR (about 8 μg per lane) and PK-treated SR (about 4 μg per lane) were first phosphorylated from P_i for 15 minutes at 20°C in 25 % DMSO. Then they were submitted to SDS-PAGE under different conditions: from left to right, (i) Sarkadi gels, 7 % acrylamide, run in the cold room; (ii) Sarkadi gels, 7 % acrylamide, run at room temperature; (iii) Laemmli gels, 12 % acrylamide in 1 mM Ca^{2+} , run at room temperature.

Note that in addition to ^{32}P labelling of intact ATPase (or large proteolytic bands), a very faint labelling by ^{32}P shows up in the region corresponding to M55 and calsequestrin in intact SR (0.5% of the labelling of intact ATPase; see dashed arrow). We do not know the origin of these few ^{32}P counts. The few other counts found on top of the gel presumably correspond to aggregated material.

20 μl aliquots of resuspended samples (i.e. amounts identical to those deposited for electrophoresis) were also counted simultaneously with the PhosphorImager, together with the dried gels, allowing easy comparison between the initial radioactivity of the phosphorylated sample and that remaining associated with the protein band(s) after electrophoresis. Less than half of the former was lost during electrophoresis (data not shown, but see also legend to Figure 2).

Solubilization and elution of the p95C/p14N complex in the presence of detergent.

In two different experiments, we asked whether the complementary p14N and p95C fragments arising from cleavage remained associated after detergent solubilization of PK-treated membranes.

In the first of these experiments, after proteolysis under usual conditions (except for the absence of Mg^{2+}) and PMSF addition, or after control treatment in the absence of PK, samples were cooled to 4°C, and 10 mg/ml DM (final concentration) was added together with 1 mM Ca^{2+} (to solubilize most of the protein without too much denaturation). Samples (180 μ l, containing about 300 μ g of protein) were centrifuged to eliminate non-solubilized material (Beckman TL 100 centrifuge, TLA100 rotor, 50,000 rpm for 5 min at 8°C) and the supernatant was loaded on a TSK 3000SW HPLC column for size exclusion chromatography and delipidation in the presence of DM. The eluant in the column contained 50 mM Mops-NaOH at pH 7, 50 mM NaCl and 0.4 mg/ml DM. PK-treated samples displayed an elution pattern with a main peak at essentially the same position as the one where uncleaved monomeric Ca^{2+} -ATPase elutes (e.g. *ref. 11*); this peak (about 0.75 ml) was collected, diluted with an equal amount of 50 mM Mops-Tris (pH 7) and 0.4 mg/ml DM (to reduce the salt content), and concentrated to about 50 μ l with YM100 Centricon device (Beckman Avanti J20XP centrifuge, JA12 rotor, 1000 g for 30 min at 4°C). An aliquot of the sample was then loaded onto a 12 % Laemmli gel for SDS-PAGE, Western Blotting on Immobilon membranes and immunodetection with an antibody against residues 1-15 of Ca^{2+} -ATPase (3), while other aliquots were used for MALDI-TOF analysis of p14N (to be described below in *Figure D*). After PK treatment, the p14N fragment was found to indeed be present (*Figure B* below) in the fraction corresponding to monomeric ATPase, where the “p83C/p28N” complex resulting for cleavage at Thr²⁴²-Glu²⁴³ also elutes together with residual intact ATPase (3). Thus, p14N presumably eluted in association with the larger p95C peptide.

In the second series of these experiments, deoxycholate-purified Ca^{2+} -ATPase membranes were treated for 10 minutes with Proteinase K (0.03 mg/ml PK, 2 mg/ml DOC-ATPase, 5 mM Mg^{2+} , 0.5 mM EGTA, 100 mM Mops at pH 6.8 and 20°C), in the additional presence of thapsigargin (50 μ M). The presence of thapsigargin during PK treatment was found to result in increased formation of p95 at the expense of p83 and intact ATPase, which was helpful for these experiments (whereas thapsigargin is counterproductive for the functional studies described in the rest of this work). After PK arrest, addition of Ca^{2+} and centrifugation, as before, resuspended membranes were solubilized by C₁₂E₈ (C₁₂E₈ to protein ratio was 10 to 1 w/w). After pelleting non-solubilized material, the supernatant was applied to a 3000SW 0.75 x 30 cm HPLC column with an 0.75 x 6 cm guard column, equilibrated and eluted with 100 mM NaCl, 20 mM Tes-NaOH, 5 mM Mg^{2+} , 0.5 mM Ca^{2+} and 1 mg/ml C₁₂E₈ at pH 7. Eluted fractions were collected and aliquots were examined by SDS-PAGE on an 11 % Tricine gel (4). Judging from Coomassie Blue staining, p95C and p14N are present in these fractions (corresponding to the “monomeric” region of the elution pattern) in relative amounts consistent with the formation of a stoichiometric complex (*Fig C* below), again suggesting that the two ATPase fragments resulting from cleavage at Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰ remain closely associated despite the presence of detergent, as was previously demonstrated for the p83C and p28N fragments (3).

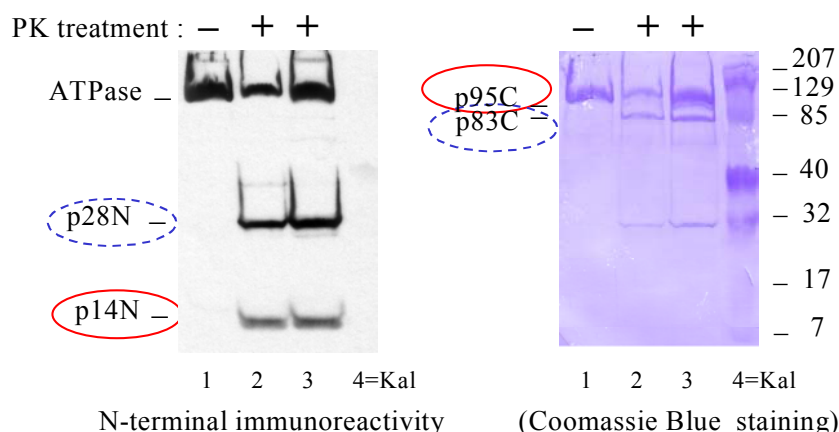


Figure B. N-terminal immuno-reactivity analysis by Western blot (left) and Coomassie Blue staining after SDS-PAGE separation and blotting (right) of samples eluting in the solubilized “monomer” fraction.

The fraction analyzed was the one where uncleaved solubilized monomeric ATPase normally elutes from a DM-equilibrated size-exclusion column. Here, this column had been loaded either with DM-solubilized intact SR membranes (-, lane 1) or with DM-solubilized PK-treated SR membranes (+, two different samples in lanes 2 and 3); lane 4 contained “Kaleidoscope” (BioRad) markers. Apparently, the p14N peptide was poorly retained on the blot.

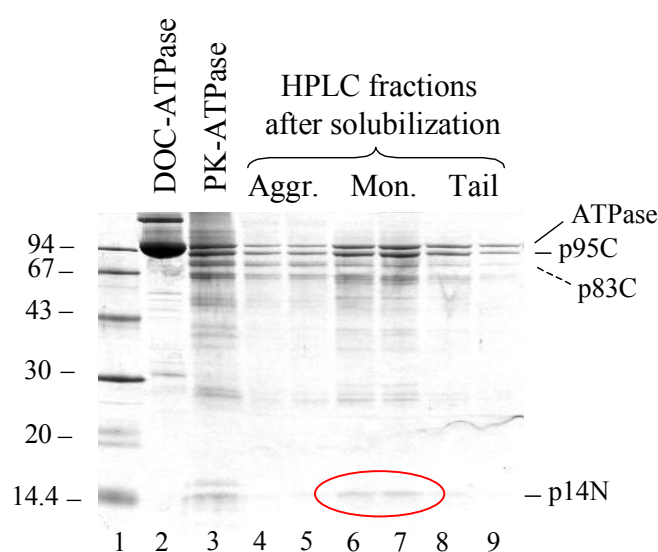


Figure C. SDS-PAGE evidence that p95C and p14N remain associated during size exclusion HPLC in the presence of detergent.

Here, deoxycholate-purified Ca^{2+} -ATPase membranes (DOC-ATPase, lane 2), were treated with Proteinase K in the additional presence of thapsigargin, as mentioned above, to produce larger amounts of p14N, and solubilized before chromatography. Eluted fractions were examined by SDS-PAGE on a 11 % Tricine gel (4) and stained with Coomassie Blue: lanes 4 and 5 correspond to early fractions, containing aggregated material; lanes 6 and 7 correspond to the peak fractions where monomeric ATPase elutes when the experiment is performed with uncleaved ATPase, and lanes 8 and 9 correspond to later fractions, collected during the falling phase of this peak and therefore containing smaller size complexes. Lane 3 corresponds to the initial sample applied to the column. Lane 1 shows molecular mass standards.

Mass spectrometry analysis of the p14N fragment

The exact identity of the p14N fragment was checked by MALDI-TOF. This was first done by using without further separation an aliquot of the p95C/p14N complex eluted from the size exclusion column at the position where monomeric ATPase normally elutes (lane 3 in Figure B). A prominent peak at 13404 was found (Figure D below), nicely corresponding to the blocked 1-119 peptide, whose theoretical $[M+H]^+$ value is 13404.3.

Nevertheless, as this value is very close to that for another conceivable fragment of ATPase, peptide 120-243 (whose theoretical average $[M+H]^+$ value is 13402.4), we submitted the p14N fragment (cut off from an SDS-PAGE gel) to further degradation by trypsin, and analyzed the resultant low molecular weight tryptic peptides (*inset to Figure D*). Among those, two fragments evidently arising from the 1-119 peptide were found: peptide Y³⁶-K⁴⁷ (N-terminal cut after K³⁵) (whose theoretical monoisotopic $[M+H]^+$ value is 1343.6) and peptide S⁸-R³¹ (N-terminal cut after K⁷) (whose theoretical monoisotopic $[M+H]^+$ value is 2631.2). In addition, a prominent peak showed up at 815.25, which corresponds to the acetylated M¹-K⁷ peptide (whose theoretical monoisotopic $[M+H]^+$ value is 815.4) and confirms the blockade of the ATPase N-terminus.

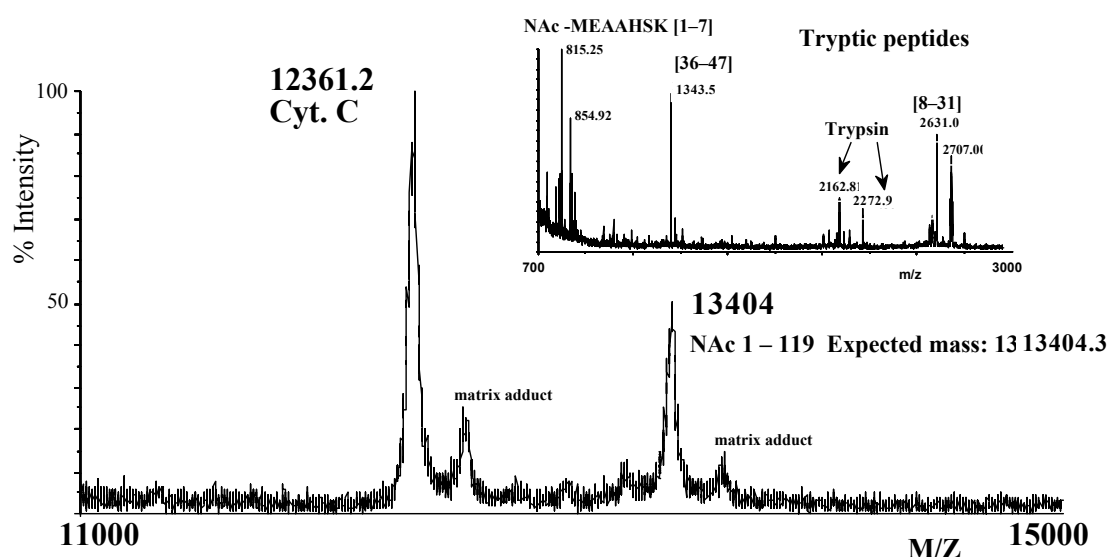


Figure D. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of the N-terminal p14N fragment, either intact or after further cleavage by trypsin.

For the experiment illustrated in the *main Panel*, 1 μ l of the HPLC-purified and delipidated protein sample in its detergent environment was mixed with 1 μ l of cytochrome c from bovine heart, corresponding to 500 femtomoles. Two microliters of saturated solution of sinapinic acid in 30 % acetonitrile and 0.3 % trifluoroacetic acid were added, and 1 μ l of this mixture was loaded on the MALDI target. Spectra were acquired in linear mode using delayed extraction, with an accelerating voltage of 20 kV. The cytochrome c in the loaded sample provided an internal calibration. For the experiment illustrated in the *inset*, an aliquot (about 10 μ g) of the same HPLC-isolated sample was loaded on a denaturing, Laemmli-type 12 % acrylamide gel, submitted to electrophoresis and stained; the band corresponding to p14 was then cut off and treated with 250 ng of trypsin after removal of stain and SDS, as previously described (12). One microliter of the tryptic mixture was mixed with 1 μ l of saturated solution of α -cyanohydroxycinnamic acid in 50 % acetonitrile and 0.3 % trifluoroacetic acid, and the mixture was loaded on the MALDI target. Spectra were obtained in reflector mode using delayed extraction, with an accelerating voltage of 20 kV. External calibration was performed with a mixture of 6 peptides covering the range 900-3600 Da.

Fragments formed during PK-treatment in the absence of Ca^{2+} .

Secondary cleavage of the primary p83C and p95C ATPase fragments occurs to some extent already after 15 minutes, giving rise, for instance, to the soluble p29/30 fragments visible in lane 8 of Fig 1. Thus, in PK-treated membranes, p95C/p14N is present together with p83C/p28N complexes, residual intact ATPase, and complexes resulting from more extensive proteolysis. The cartoon in the top part of *Fig E below* illustrates this, as well as the possible existence of complexes consisting of p83C, p14N and p14b (residues 120-242, *ref. 4*). Nevertheless, by Western blotting with various antibodies, we ascertained that the “p83C” band was not contaminated with the N-terminal fragment of similar mass (“p81N”) that might have resulted (4) from ATPase cleavage around residues 734-747.

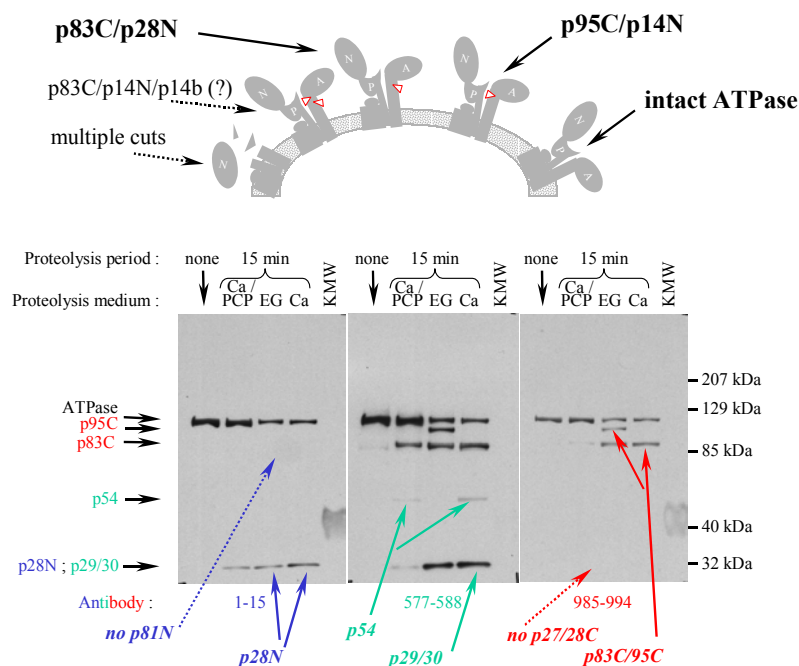


Figure E. Cartoon representation of the largest fragments formed during PK-treatment in the absence of Ca^{2+} , and Western Blot analysis of these fragments.

Top part, a cartoon illustrating the major entities present after PK treatment in the absence of Ca^{2+} : p95C/p14N complexes together with p83C/p28N complexes and residual intact ATPase, and possibly also complexes resulting from more extensive proteolysis. For the sake of simplicity, this cartoon assumes that ATPase units are monomeric. *Bottom part*, Western Blot analysis of proteinase K fragments after cleavage in the presence of Mg^{2+} , in the presence or absence of Ca^{2+} . Here, after 15 minutes treatment with proteinase K in the presence of either 0.3 mM Ca^{2+} +0.5 mM AMP-PCP (“PCP”), 0.5 mM EGTA (“EG”) or 0.3 mM Ca^{2+} alone (“Ca”), proteolysis was arrested, and 0.8 μg of each PK-treated sample (together with intact membranes (“none”) and molecular mass Kaleidoscope standards (“KMW”, BioRad) was loaded onto a Laemmli gel (with Ca^{2+}) for electrophoresis. An 8 % acrylamide was chosen to maximize separation of the high molecular weight fragments. After transfer onto PVDF membranes, the separated peptides were immuno-characterized with antibodies against the N-terminus (1-15 residues, left; note that p14N does *not* show up because low molecular weight fragments had been allowed to run out of the gel), the C-terminus (985-994 residues, right), or the central portion (577-588, center) of the ATPase, as described in *ref. 3*. Note that, in contrast with the results previously obtained when proteolysis was performed in the absence of Mg^{2+} (see Fig 2C in *ref. 4*), p81N and p27/28C peptides, resulting from cleavage at Val⁷³⁴ or Val⁷⁴⁷, were not formed in detectable amounts. Cleavage at 734-747 is therefore probably not a primary site of cleavage. Remember also that in the presence of Mg^{2+} the slowing down by AMPPCP (and Ca^{2+}) of ATPase proteolysis is very pronounced (3, 49-50).

Phosphorylation from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ of Ca^{2+} -equilibrated p95C/p14N complex is only slightly slower than that of ATPase.

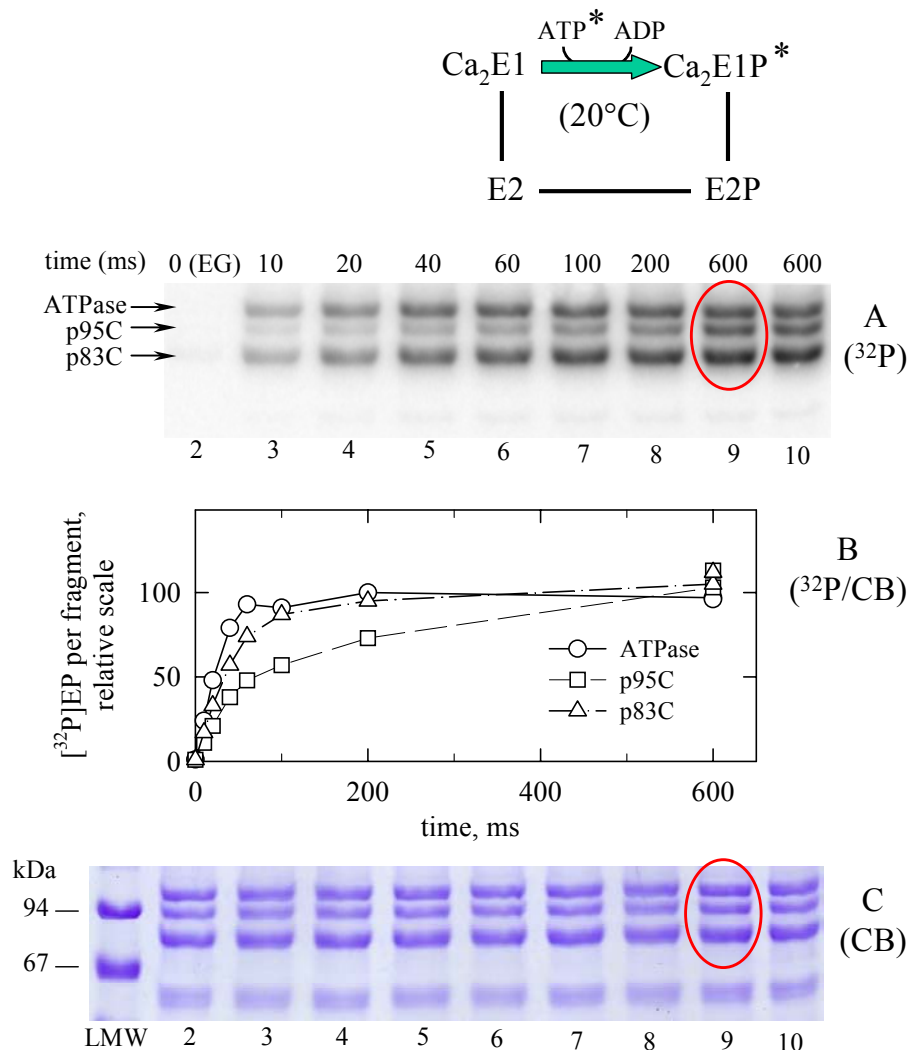


Figure F. Time-resolved phosphorylation from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, at 20°C , of p95C/p14N complex pre-equilibrated with Ca^{2+} .

PK-treated membranes, initially at 0.4 mg/ml protein in buffer A supplemented with $150\ \mu\text{M}\ \text{Ca}^{2+}$ and $100\ \mu\text{M}\ \text{EGTA}$, were mixed vol/vol with a medium containing $10\ \mu\text{M}\ [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ and again $150\ \mu\text{M}\ \text{Ca}^{2+}$ and $100\ \mu\text{M}\ \text{EGTA}$. Phosphorylated samples were acid-quenched after various periods at 20°C (except for the last lane, which is a duplicate of the previous one) in a rapid mixing-and-quenching equipment (hence the millisecond time scale) before SDS-PAGE separation of the various ATPase fragments. Panel A shows the PhosphorImager scan of the gel. From this scan and from the Coomassie Blue staining ability of the various bands (Panel C), we computed the relative ability of the various bands to retain ^{32}P (as the ratio of ^{32}P radioactivity to Coomassie Blue staining), taking the maximal phosphorylation level of intact ATPase (at 200 ms) as 100 %. The computed levels (shown in Panel B) are subject to a number of uncertainties (e.g. spillover of the heavily labelled bands onto the fainter ones nearby) or biases (e.g. differences in the molecular weight of the various fragments considered or in their ability to bind Coomassie Blue), but are a fair approximation. The actual amount of ^{32}P associated with the phosphorylated residual intact ATPase at steady state was of the order of 2 pmol. Note that in the absence of Ca^{2+} , essentially no phosphorylation from ATP showed up (lane 2), as expected. Lane 1 contained molecular mass markers (“LMW”, Pharmacia).

Ca^{2+} -dependence of p95C/p14N phosphorylation from ATP at steady-state.

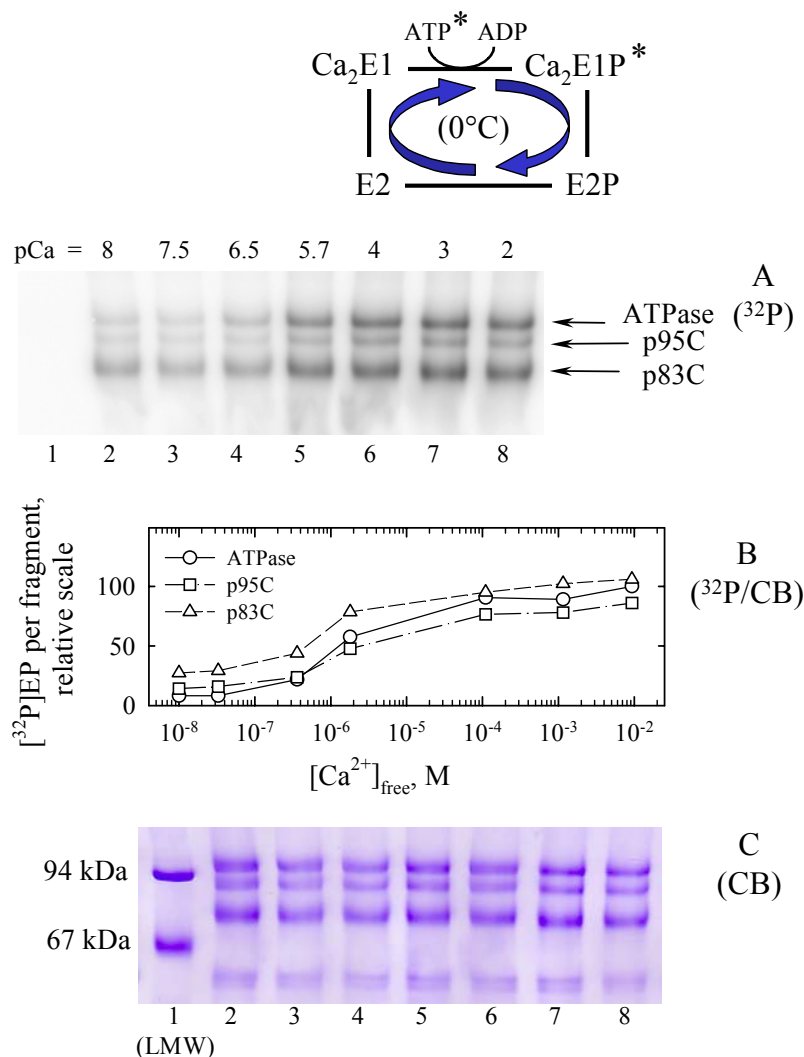


Figure G. Steady-state ATP-derived phosphorylation (on ice) of the p95C/p14N complex occurs with roughly the same apparent affinity for Ca^{2+} as for intact ATPase or p83C/p28N.

PK-treated membranes were diluted to 0.2 mg/ml protein in a final phosphorylation medium, on ice, consisting of buffer A supplemented with 5 μM [γ - ^{32}P]ATP and either 2.95 mM EGTA and 0.06 mM Ca^{2+} (lane 2) or 0.95 mM EGTA and various total concentrations of Ca^{2+} (namely 0.06, 0.4, 0.74, 1.06, 2.1 and 10 mM for lanes 3-8, respectively), and the phosphorylation level was measured after 30 s phosphorylation. Panel A shows the PhosphorImager scan of the gel. From this scan and from the Coomassie Blue staining ability of the various bands (Panel C), we computed the relative ability of the various bands to retain ^{32}P (Panel B, as in Fig 2B), taking the maximal phosphorylation level of intact ATPase band as 100 %. Lane 1 contained molecular mass markers (LMW).

The apparent affinity for Ca^{2+} deduced from these experiments was not very different for intact ATPase and for the two large peptides. Note, however, that since this assay reflects *steady-state* handling of ATP by the ATPase, this apparent affinity is *not* the true affinity for equilibrium Ca^{2+} binding (see main text). This will be discussed in relation to Fig 3 & Fig L.

The transition from ADP-sensitive to ADP-insensitive EP is reasonably fast in p95C, as in intact ATPase.

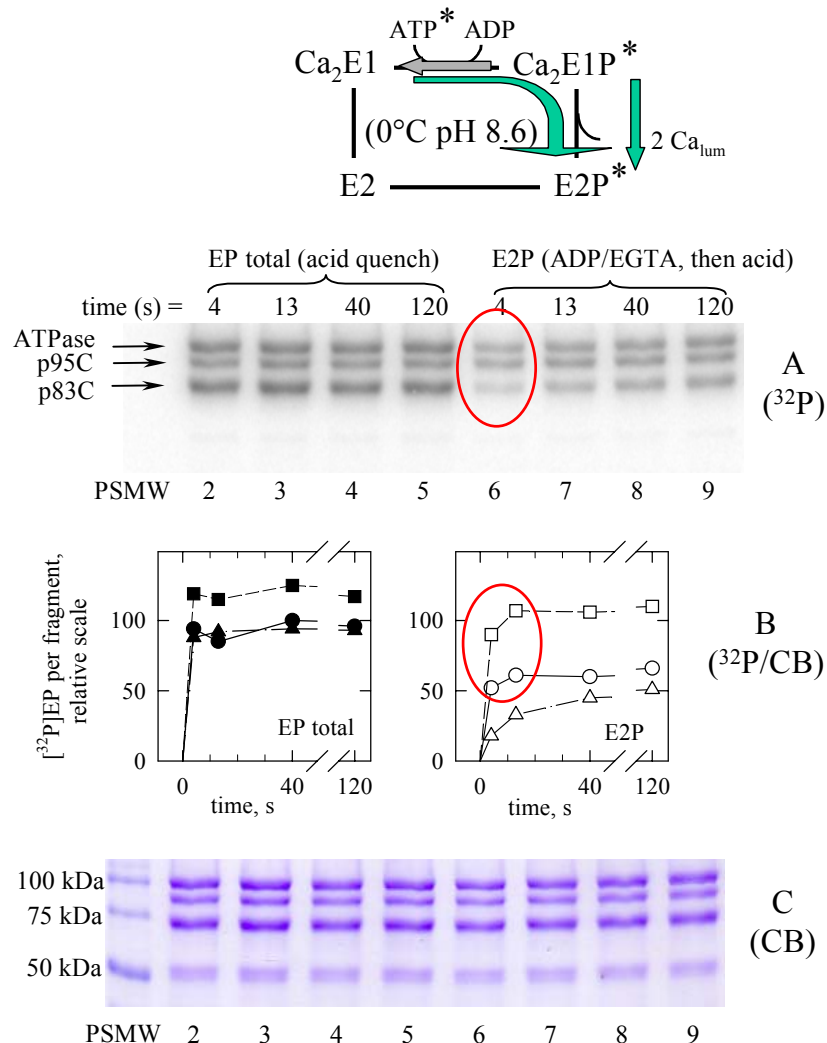


Figure H. $\text{Ca}_2\text{E1P}$ to E2P transition at alkaline pH, on ice.

PK-treated membranes were diluted to 0.1 mg/ml protein and permeabilized with calcimycin (A23187, at a final concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$) in a final ice-cold phosphorylation medium consisting of 100 mM Tes-Tris (pH 8.25 at room temperature, corresponding to about pH 8.6 on ice), no potassium, 10 mM Mg^{2+} , 105 μM Ca^{2+} and 55 μM EGTA. The medium was supplemented with 5 μM [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP, and phosphorylation was stopped after various periods either by directly adding acid, to measure the total EP formed (lanes 2-5), or by first adding 5 mM EGTA and 1 mM ADP and quenching with acid 5 seconds later, to measure the ADP-insensitive EP (lanes 6-9). Lane 1 contained molecular mass markers (PSMW). Lane 10 (not shown) contained a control in which the acid quench was performed 30 s (instead of 5 s) after ADP/EGTA addition, to confirm that E2P dephosphorylation was slow under these circumstances. Panel A shows the PhosphorImager scan. From this scan and from the Coomassie Blue staining ability of the various bands (Panel C), we computed the relative ability of the various bands to retain ^{32}P , taking the maximal phosphorylation level of intact ATPase (at 40 s, lane 4) as 100 % (Panel B: left, total EP; right, ADP-insensitive EP). Under these alkaline conditions, essentially all EP in p95C (squares) was ADP-insensitive ("E2P"), as also found at pH 7 (see Fig 3B), and the rate of its appearance was apparently not slowed down compared to intact ATPase (circles); in contrast, the $\text{Ca}_2\text{E1P}$ to E2P transition was slowed down for p83C (triangles), as expected (3).

Phosphorylation from [^{32}P]Pi of the p95C/p14N complex occurs with quasi-normal affinity for Mg^{2+} , but inhibition by vanadate is less pronounced.

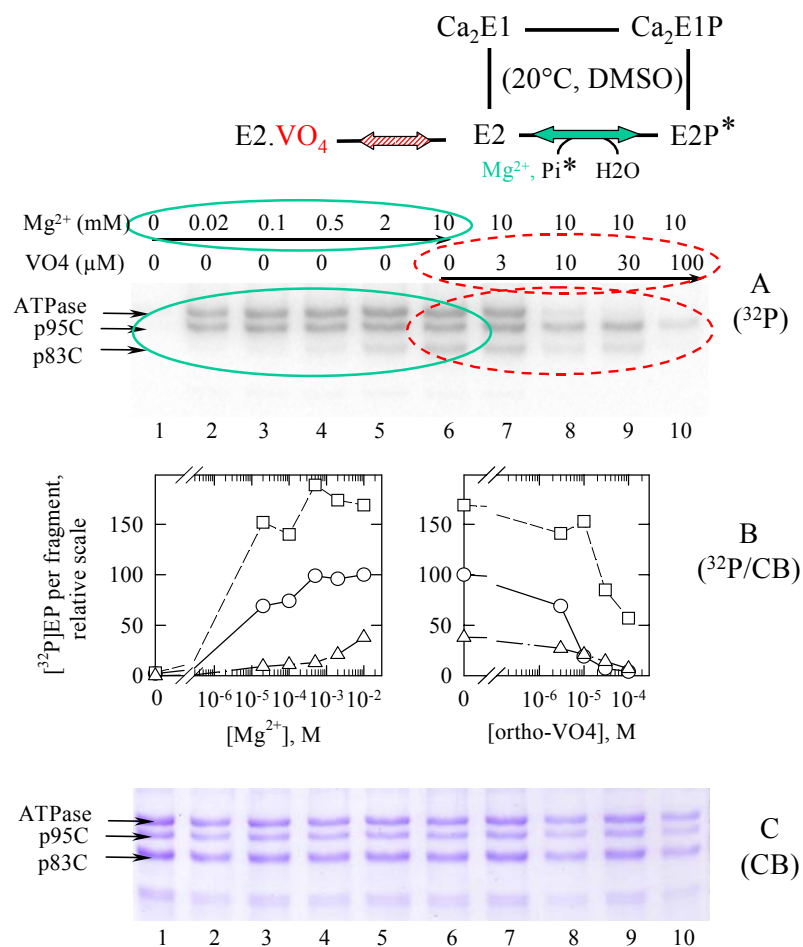


Figure 1. Phosphorylation from [^{32}P]Pi of the p95C/p14N complex at different concentrations of Mg^{2+} , and inhibition by vanadate.

PK-treated and resuspended membranes (about 1 mg/ml) were incubated at 20°C for 65 minutes in buffer B supplemented with 25 % DMSO, 1 mM EGTA, 200 μM [^{32}P]Pi, and either various concentrations of Mg^{2+} (lanes 1-6; lane 1, with "zero" Mg^{2+} , corresponds to a sample where 0.5 mM EDTA was added), or 10 mM Mg^{2+} and various concentrations of ortho-vanadate (lanes 6-10). Panel A shows the PhosphorImager scan. From this scan and from the Coomassie Blue staining ability of the various bands (Panel C), we computed the relative ability of the various bands to retain ^{32}P (Panel B), taking the phosphorylation level of intact ATPase at 10 mM Mg^{2+} and no vanadate (lane 6) as 100 %. Circles: intact ATPase; squares, p95C peptide; triangles, p83C peptide. Note that: (i) The design of the Mg^{2+} -dependence experiment was far from perfect, as we tested phosphorylation in a range of Mg^{2+} concentrations too high to precisely reveal the apparent affinity for Mg^{2+} ; it is nevertheless clear that the apparent affinity of p95C for Mg^{2+} is not much shifted, whereas this is the case for p83C. (ii) The design of the vanadate-dependence experiment was more or less copied from a similar one in *ref. 39*, except that in our case there was no preincubation with vanadate before phosphorylation from Pi, but simple competition over 65 minutes. Interpretation of such an experiment is not straightforward, because of interdependence between the reaction with Pi and the reaction with vanadate; but, as we previously found that the "true" affinity for Pi was similar for intact ATPase and p95C, the fact that vanadate proves to be a weaker apparent competitor of Pi for p95C than for intact ATPase must probably be assigned to a weaker true binding of vanadate. A more straightforward assay of the true affinity of p95C for vanadate is shown in *Fig 6* in the main text.

In DMSO at 20°C too, both phosphorylation from [32 P]Pi of the p95C/p14N complex and dephosphorylation upon Pi chase are slowed down.

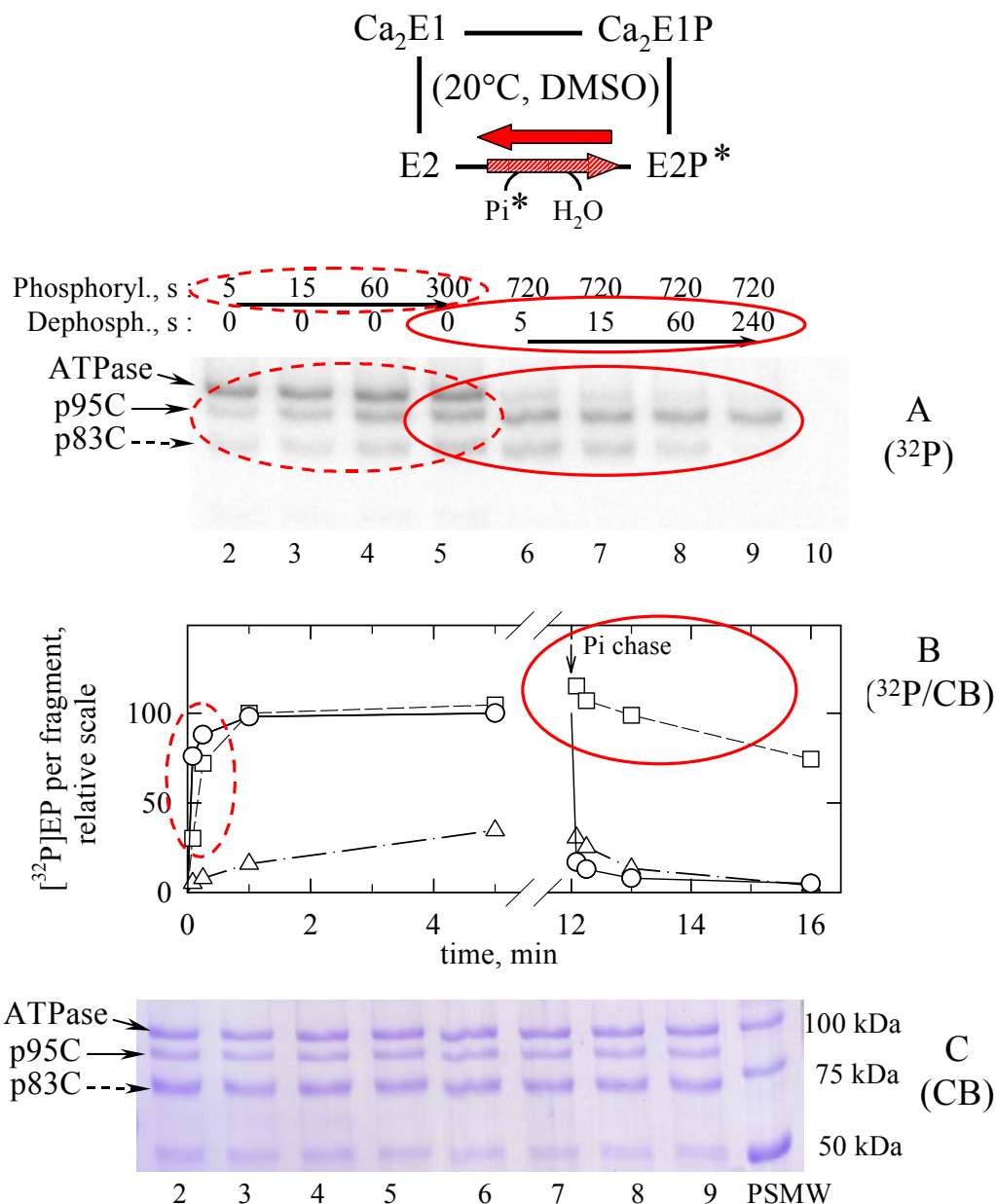


Figure J. Phosphorylation from [32 P]Pi of the p95C/p14N complex in DMSO at 20°C is slow, and dephosphorylation upon Pi chase is also slow.

The kinetics of phosphorylation by [32 P]Pi were measured at 20°C in buffer B supplemented with 25 % DMSO, 1 mM EGTA and 200 μM [32 P]Pi (lanes 2-5). After 12 min of such phosphorylation, dephosphorylation was triggered by adding 20 mM non-radioactive Pi to the same medium (with only 10 % resulting dilution of the sample, i.e. the DMSO concentration remained high), and the kinetics of dephosphorylation were measured (lanes 6-9). Lanes 1 -not shown- and 10 contained molecular mass markers (LMW and PSMW, respectively). Panel A shows the PhosphorImager scan. From this scan and from the Coomassie Blue staining ability of the various bands (Panel C), we computed the relative ability of the various bands to retain ^{32}P (Panel B), taking the phosphorylation level of intact ATPase after 300 s as 100 %. Circles: intact ATPase; squares, p95C peptide; triangles, p83C peptide.

At 20°C, the E2 to Ca₂E1 transition is again slower for the p95C/p14N complex than for intact ATPase or the p83C/p28N complex.

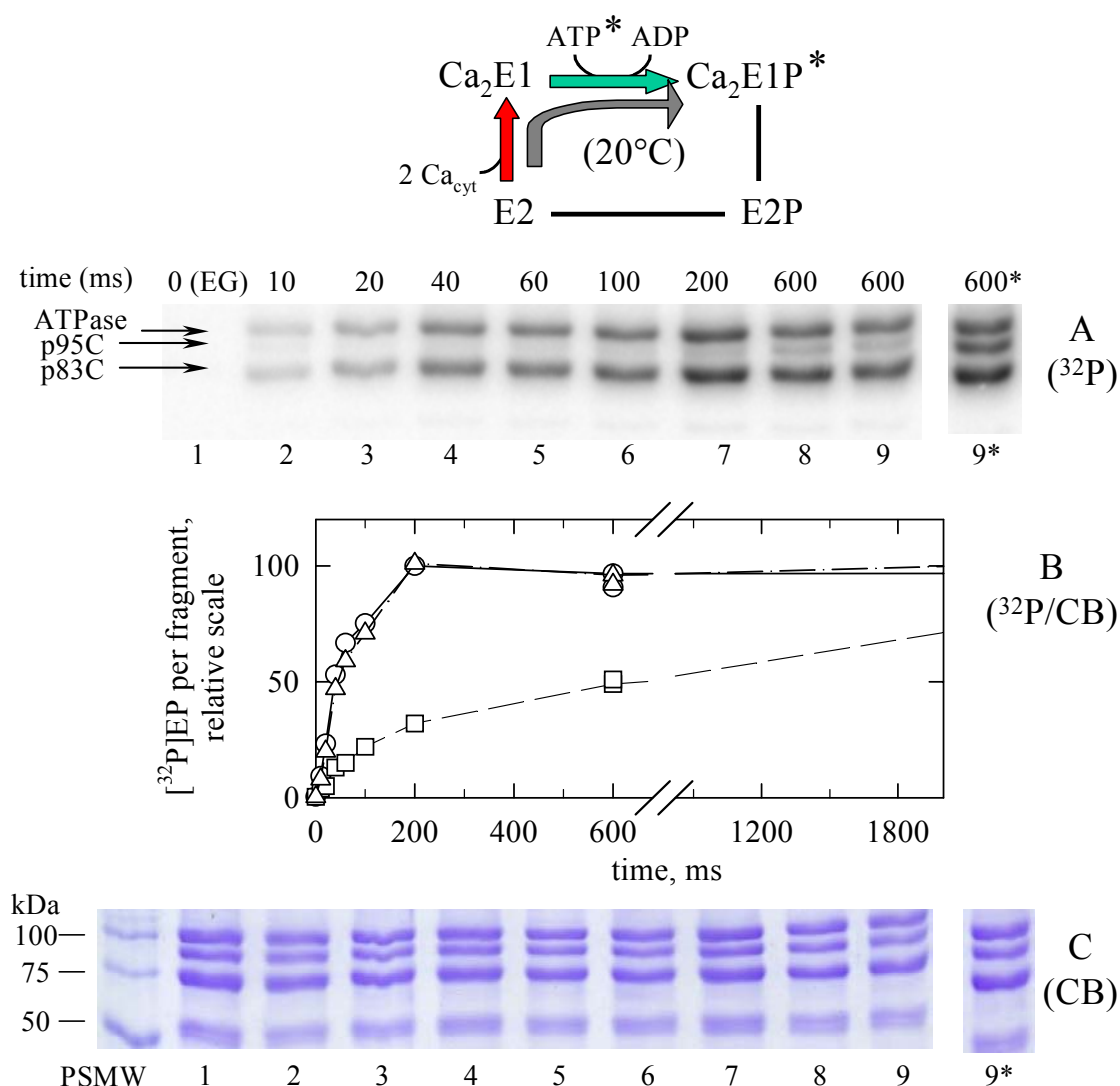


Figure K. Phosphorylation from [γ -³²P]ATP of the p95C/p14N complex, pre-equilibrated in a Ca²⁺-deprived state, is also slow at 20°C.

This experiment was similar to the one corresponding to lanes 2-4 in *Fig 5*, except that temperature was 20 °C, as for *Fig F*. PK-treated membranes, initially at 0.4 mg/ml protein in buffer A supplemented with 200 μ M EGTA, were mixed vol/vol with a medium containing 10 μ M [γ -³²P]ATP and 300 μ M Ca²⁺, and acid-quenched after various periods in a rapid mixing-and-quenching equipment (hence the millisecond time scale). The lane before Lane 1 (shown in *Panel C*) contained molecular mass markers (PSMW). Panel A shows the PhosphorImager scan. From this scan and from the Coomassie Blue staining ability of the various bands (*Panel C*), we computed the relative ability of the various bands to retain ³²P (*Panel B*), taking the maximal phosphorylation level of intact ATPase as 100 %. Circles: intact ATPase; squares, p95C peptide; triangles, p83C peptide. The lane labeled “9*” (or 600 ms*) is taken from the gel previously illustrated in *Fig F* above, resulting from an experiment performed in parallel and in which ATP was added to Ca²⁺-equilibrated membranes. The 600 ms* situation in that experiment is considered to be a fair estimate of the steady state situation to be obtained (hence the dotted lines in *Panel B* of the present Figure) when membranes are initially Ca²⁺-free.

The « true » affinity for Ca^{2+} binding indeed is slightly poorer for p95C than for intact ATPase

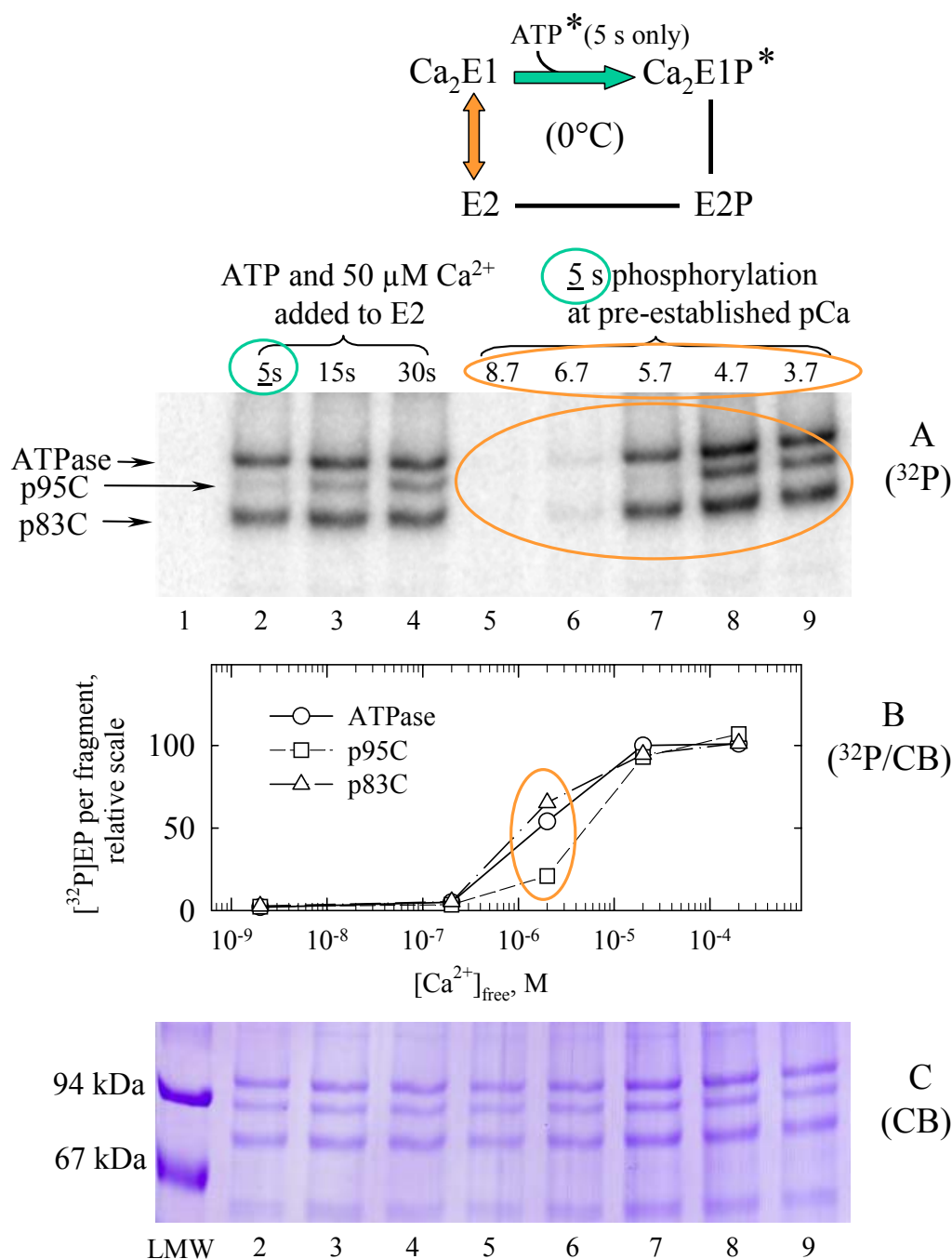


Figure L. Phosphorylation levels after short periods of time, starting from various free Ca^{2+} concentrations.

Lanes 2-4 are a repetition of lanes 2-4 in Fig 5, in which Ca^{2+} -free PK-SR was reacted with 50 μM free Ca^{2+} and 5 μM [γ - ^{32}P]ATP simultaneously. Lanes 5-9 correspond to phosphorylation measurements where PK-treated membranes were first incubated at various pCa values, and phosphorylation from [γ - ^{32}P]ATP at this pCa value was measured after 5 s reaction only. Lane 1 contained molecular mass markers (LMW). Panel A shows the PhosphorImager scan. From this scan and from the Coomassie Blue staining ability of the various bands (Panel C), we computed the relative ability of the various bands to retain ^{32}P (Panel B), taking the phosphorylation level of intact ATPase in lane 9 as 100 %.

Additional Discussion : phosphorylation properties of the p83C peptide.

It has been mentioned in the main text that the phosphorylation properties of the p83C peptide found in the present study were in nice agreement with those found in our previous study of the p83C/p28N complex (3). However, it has also been mentioned, and explicitly illustrated in the cartoon of *Fig E*, that after ATPase treatment with PK in the presence of EGTA, it was conceivable that not only singly cleaved but also *doubly cleaved* chains would be present, consisting of (p83C+p14N+p14b) complexes, coexisting with the singly cleaved p83C/p28N and p95C/p14N complexes. Two questions then arise, namely: (i) do these ternary complexes exist in significant amounts, and (ii) if these doubly cleaved chains are produced, what are their catalytic properties?

We think that the answer to question (i) is yes. There is no *a priori* reason to assume that a p95N/p14N complex would escape being cleaved once more, this time at Glu²⁴³, producing a (p83C+p14N+p14b) complex, and Fig 1 provides two reasons for thinking that this is indeed the case. Firstly, comparing lanes 7 and 8 shows that more p83C (and more p14N) has been formed after 15 minutes cleavage than after 5 minutes, but that the amount of p95C has not much changed, suggesting that p83C originates not only from primary cleavage of intact ATPase, but also from secondary cleavage of p95C at Glu²⁴³. Secondly, the amounts of Coomassie Blue bound to the p95C and p83C peptides after 15 minutes (lane 8) are about in a 1:2 ratio, suggesting about the same 1:2 ratio in molar stoichiometry of the two peptides (as these two peptides have fairly similar masses); if p95C had *not* been able to undergo further cleavage at Glu²⁴³, the molar amounts of p14N and p28N would then also be in the same 1:2 molar ratio, i.e. the protein masses in these bands corresponding to 14 and 28 kDa peptides would be in a 1:4 ratio, which is certainly not the case (it is closer to 1:1, see lane 8). Hence, it seems that a significant fraction of the p83C peptide complements an already cleaved (p14N+p14b) N-terminus -instead of complementing the primary cleavage product p28N.

The question then arises whether the presence of a few (p83C+p14N+p14b) complexes gives rise to distinct features in our functional assays. In this respect, it is perhaps significant that in the present work, we were able to see very slow dephosphorylation of part of the p83C peptide (*Fig 2*, and *Fig J* in the present “*Supplemental Material*”). This could conceivably reveal the cut at L¹¹⁹-K¹²⁰. It is, however, also conceivable (and perhaps likely) that in doubly cleaved ATPase, the three peptides do not always stay associated (as in our previous work, p14b peptides were found both in the supernatant and in the pellet after centrifugation of PK-treated membranes, suggesting loose binding (*ref. 4*, Table I), with the consequence that the p83C peptides left solitary do not phosphorylate at all.

Additional Discussion : models for the ATPase transition state.

Two models have been proposed for decavanadate-reacted Ca^{2+} -ATPase (Protein Data Bank accession codes 1FQU (1) and 1KJU (38)), an ATPase form that probably also contains orthovanadate and may therefore provide the best presently available approximation of the transition state of the protein during dephosphorylation. In this ATPase form, both models suggest changes relative to the E2 form (1IWO), consisting in particular in a lifting up of the *A*-domain towards the *P*-domain, accompanied by a stretching of the S1-S3 segments. In 1FQU (see Fig. M below) it is somewhat disappointing that bonds shown to be present in the E2 form between S2 and the *P*-domain (namely the electrostatic interaction between Glu¹¹³ and Arg³³⁴ and the H-bond between Tyr¹²² and Val⁷²⁶) are now broken and not replaced by new stabilizing bonds between S2 and the *P*-domain (instead, Glu¹¹³ and Glu¹²³ reorient to form bonds with Arg⁴⁷ and Leu⁴¹, respectively, in the S1-loop); from this structure, it is not clear why proteolysis at Leu¹¹⁹-Lys¹²⁰ would prevent proper interaction of the *A*- and *P*-domains. On the other hand, in the 1KJU modeled structure, which is more compact than 1FQU and in which the TGES residues are placed in closer apposition to the phosphorylatable Asp³⁵¹ residue, the flexible loops between the various domains have been rebuilt and energy-minimized (38). In this model the resulting structure does suggest the formation of many new bonds between S2 and the central part of the N-terminal structure, including residues in the immediate proximity of the proteolytic cleavage site (Fig. M).

Of course, future high resolution structures of 3D crystals of a transition-like state will be necessary to confirm or reject this possibility. At this step, however, the above possibility does not seem implausible, especially in view of recent results concerning the Glu⁴⁰-Ser⁴⁸ loop of the S1 segment (51). In that work it was beautifully demonstrated that single deletion of any of the residues in that loop causes a dramatic slowing down of both the $\text{Ca}_2\text{E1P}$ to E2P transition and the E2P to E2 transition, although simple mutation of the same residues had essentially no effect. This shows that the length of the S1 loop is critical for allowing the ATPase to reach its E2P state, as if formation of the catalytic site for optimal dephosphorylation or phosphorylation from Pi requires some further movement of the *A*-domain away from the membrane, as suggested in both the 1FQU and 1KJU modeled structures.

H-bonds between S2 and the rest of the ATPase in the various structures available for Ca^{2+} -depleted ATPase

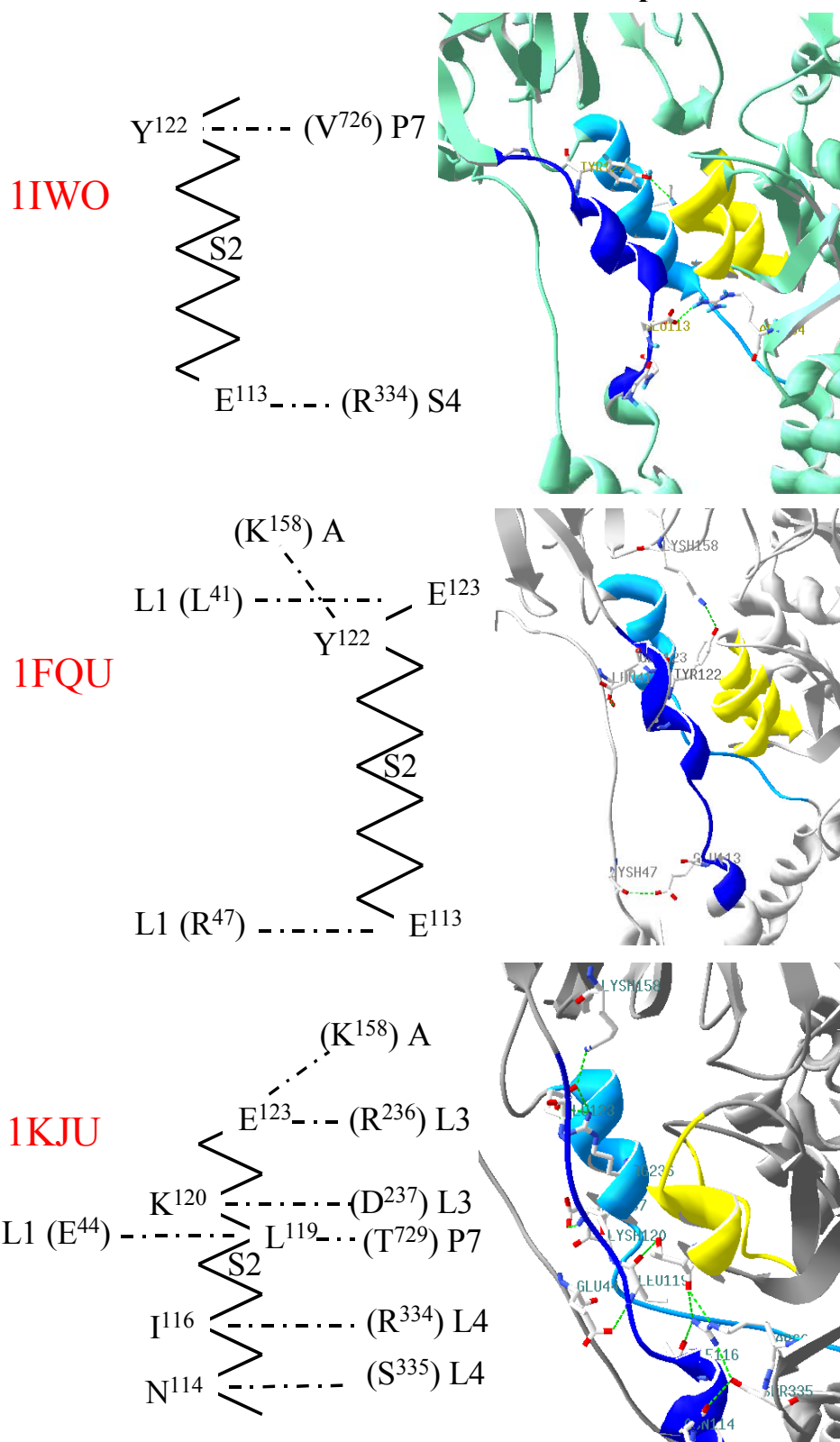


Figure M. H-bonds between S2 and the rest of the ATPase in the various structures available for Ca^{2+} -depleted ATPase.

Top: 1IWO; middle, 1FQU; bottom, 1KJU. The ATPase is viewed from the back relative to Fig 8. In this cartoon, residues 111-124 are colored dark blue, residues 230-247 are colored light blue, P6 and P7 are colored yellow. Bonds were predicted by SwissPDBViewer. NB: in the structure of Ca^{2+} -bound ATPase (1EUL, not shown), S2 interacts with S4 (on top of M4) via the Tyr¹²²-Arg³²⁴ and the Glu¹²³-Arg³³⁴ bonds.

Manuscript # 2:

Involvement of the L6-7 loop in SERCA1a Ca^{2+} -ATPase activation by Ca^{2+} (or Sr^{2+}) and ATP.

Lenoir, G., Picard, M., Møller, J.V., le Maire, M., Champeil, P., and Falson, P. (2004)

J. Biol. Chem. 279, 32125-32133.

Involvement of the L6–7 Loop in SERCA1a Ca^{2+} -ATPase Activation by Ca^{2+} (or Sr^{2+}) and $\text{ATP}^*\text{[S]}$

Received for publication, March 16, 2004, and in revised form, May 11, 2004
Published, JBC Papers in Press, May 21, 2004, DOI 10.1074/jbc.M402934200

Guillaume Lenoir^{‡§}, Martin Picard[‡], Jesper V. Møller[¶], Marc le Maire[‡], Philippe Champeil[‡], and Pierre Falson^{‡||}

From the [‡]Unité de Recherche Associée 2096, the Centre National de la Recherche Scientifique and Section de Biophysique des Fonctions Membranaires, Département de Biologie Joliot Curie, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, and Laboratoire de Recherche Associé 17V and Institut Fédératif de Recherches 46, Université Paris Sud, France and the [¶]Department of Biophysics, University of Aarhus, DK-8000 Aarhus C, Denmark

Wild-type (WT) and the double mutant D813A,D818A (ADA) of the L6–7 loop of SERCA1a were expressed in yeast, purified, and reconstituted into lipids. This allowed us to functionally study these ATPases by both kinetic and spectroscopic means, and to solve previous discrepancies in the published literature about both experimental facts and interpretation concerning the role of this loop in P-type ATPases. We show that in a solubilized state, the ADA mutant experiences a dramatic decrease of its calcium-dependent ATPase activity. On the contrary, reconstituted in a lipid environment, it displays an almost unaltered maximal calcium-dependent ATPase activity at high (millimolar) ATP, with an apparent affinity for Ca^{2+} altered only moderately (3-fold). In the absence of ATP, the true affinity of ADA for Ca^{2+} is, however, more significantly reduced (20–30-fold) compared with WT, as judged from intrinsic (Trp) or extrinsic (fluorescence isothiocyanate) fluorescence experiments. At low ATP, transient kinetics experiments reveal an overshoot in the ADA phosphorylation level primarily arising from the slowing down of the transition between the nonphosphorylated “E2” and “ $\text{Ca}_2\text{E1}$ ” forms of ADA. At high ATP, this slowing down is only partially compensated for, as ADA turnover remains more sensitive to orthovanadate than WT turnover. ADA ATPase also proved to have a reduced affinity for ATP in studies performed under equilibrium conditions in the absence of Ca^{2+} , highlighting the long range interactions between L6–7 and the nucleotide-binding site. We propose that these mutations in L6–7 could affect protonation-dependent winding and unwinding events in the nearby M6 transmembrane segment.

Muscle relaxation occurs by of the removal of calcium from the cytosol and its accumulation into sarcoplasmic reticulum

* This work was supported by the Commissariat à l’Energie Atomique (CEA), the “Centre National de la Recherche Scientifique,” Human Frontier Science Program Organization funds (to M. P.), and by a fellowship of the “Ministère de la Recherche et de la Technologie” and the “Fondation pour la Recherche Médicale” (to G. L.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains Figs. A–I.

§ Present address: Dept. of Membrane Enzymology, Center for Biomembranes and Lipid Enzymology, Utrecht University, 3584 CH Utrecht, The Netherlands.

|| To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-1-69089882; Fax: 33-1-69331351; E-mail: pierre.falson@cea.fr.

(SR)¹ through an active transport that consumes ATP (1, 2). In fast twitch muscle this transport is achieved by the SERCA1a isoform of Ca^{2+} -ATPase (3), with a stoichiometry of two calcium ions transported per ATP molecule hydrolyzed (see reviews in Refs. 4 and 5). SR Ca^{2+} -ATPase belongs to the family of P-type ATPases, which transport cations such as H^+ , Na^+ , K^+ , or Ca^{2+} across the membrane and share a common mechanism that involves autophosphorylation of the protein (see review in Ref. 6): transport is achieved through a reversible cycle, during which the ATPase is thought to sequentially adopt two main conformations (7, 8), E1 and E2, with a high and low affinity for the transported ion, and the overall cycle corresponds to completion of the following scheme: $\text{E2} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E1} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E1} \sim \text{P} \rightarrow \text{E2P} \rightarrow \text{E2}$ (for review, see Refs. 9 and 10). Much effort has gone into determining the structural organization of SR Ca^{2+} -ATPase from primary structure predictions (11), electron microscopy (12), and three-dimensional crystallography (13–15) (for a recent review see Ref. 16). Finally, the structure has been solved at the atomic level, first in a $\text{Ca}_2\text{E1}$ state (14) and then in a thapsigargin-stabilized E2 state (15). The membrane domain contains two calcium-binding sites, distant from the phosphorylation (P) and the nucleotide-binding (N) domains, with calcium liganding residues consistent with the results previously obtained by site-directed mutagenesis (17, 18). Comparison of these two three-dimensional structures shows that the cytosolic domains undergo very large movements, being separated from each other in $\text{Ca}_2\text{E1}$ while they are in close contact in E2.

Previously, by combining limited proteolysis and site-directed mutagenesis, we have drawn attention to the cytosolic L6–7 loop, connecting transmembrane segments 6 and 7 and stretching from Phe⁸⁰⁹ to Ser⁸³⁰ (19–21). Cluster mutations D813A,D818A (ADA) or D813A,D815A,D818A (AAA) in this loop were found to reduce the Ca^{2+} -dependent ATPase activity of the protein in its solubilized state (19) as well as the apparent affinity for calcium for the protein, suggesting a role of the L6–7 loop in activation by calcium during the early steps of the cycle (20). The reduction of the cation binding ability of the Ca^{2+} -ATPase L6–7 loop after mutation was confirmed by studying a chemically synthesized peptide corresponding to the L6–7 loop, Gly⁸⁰⁸–Pro⁸²⁷, which was found to interact with calcium and to bind lanthanum, in contrast with a related

¹ The abbreviations used are: SR, sarcoplasmic reticulum; SERCA1a, 1a isoform of the SR Ca^{2+} -ATPase; WT, wild type; ADA, D813A,D818A double mutant of SERCA1a; Ni-NTA, Ni²⁺-nitrilotriacetic acid; DDM, β -D-dodecyl maltoside; EYPC, egg yolk 1- α -phosphatidylcholine; EYPA, egg yolk phosphatidic acid; FITC, fluorescein isothiocyanate; Tes, 2-[(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)amino]ethanesulfonic acid; Mops, 4-morpholinepropanesulfonic acid.

peptide in which an AAA cluster mutation had been introduced (21). In another laboratory both the ADA ATPase mutant and a more conservative related one, D813N,D818N, were found to bind less $^{45}\text{Ca}^{2+}$ than WT in the presence of a micromolar Ca^{2+} concentration (22). The L6–7 loop was thus suggested to provide an entrance port for calcium, with the negatively charged aspartic residues involved in a pre-binding site (21), and recent computer simulations accepted this view (23). However, evidence has been obtained from the three-dimensional structure of the Ca^{2+} -ATPase that the L6–7 loop was located too far away from the two high affinity calcium-binding sites to participate directly in the binding of calcium to these sites; this was confirmed by our finding fact that WT and mutant (ADA) ATPases were both able to occlude calcium in the presence of Cr-ATP (21). A detailed site-directed mutagenesis study of several residues of the L6–7 loop then suggested that the main role of this loop was to stabilize the ATPase structure and the cross-talk between the Ca^{2+} -binding and phosphorylation domains, through an extended network of hydrogen bonds (24). A comparable study carried out with Na^+, K^+ -ATPase revealed that removal of the negatively charged residues in the corresponding loop only had a moderate effect on the affinity of the enzyme for potassium, but made the mutants more sensitive to denaturation by SDS (25). From all the above experiments, it appears that the L6–7 loop is functionally important, but that both experimental facts and interpretation still need clarification.

In view of the likely importance of this loop, we decided to investigate further the ADA mutant, now using an improved yeast overexpression system (26) together with a recently developed procedure (27, 28) to purify and reconstitute into lipids the expressed WT and mutated ATPases. This allowed us not only to use classical approaches to study these expressed proteins, but also to use fluorescence approaches (intrinsic or extrinsic (fluorescein isothiocyanate (FITC)) fluorescence) to monitor ATPase conformational changes. The latter approaches of course require a sufficient level of protein purity, and as far as we are aware, the present report is the first one with a mutated form of SERCA1a Ca^{2+} -ATPase amenable to both kinetic and spectroscopic investigation. This study allowed us to solve previous experimental discrepancies and to pinpoint the transitions affected by mutation of Asp⁸¹³ and Asp⁸¹⁸. It supports the idea that the L6–7 loop is involved in an interplay between the transmembrane Ca^{2+} -binding sites and the cytosolic domains, not only the P domain as previously suggested (24), but also the nucleotide-binding domain. Finally this work suggests specific perspectives for interpretation of the results and future work.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—The electrophoresis miniprotein 3, transblot module, GS-700 densitometer, Molecular Analyst software, and Bio-beads were from Bio-Rad. Yeast culture products were from Difco Laboratories. *N*-Dodecyl- β -D-maltoside (DDM) was from Anatrace Inc. (Anagrade) and C_{12}E_8 (octaethylene glycol monododecyl ether) was from Nikko Chemical Co. (Tokyo). Low molecular weight markers and PD-10 columns were from Amersham Biosciences. Other products were purchased from Sigma. The STORM 860 PhosphorImager was from Amersham Biosciences. The rapid mixing QFM5 device was from Biologic, Claix, France. The Multiskan Bichromatic spectrophotometer was from Labsystems. The Sigmaplot software was from SSPS, Inc. The SimZyme software was a kind gift from Dr. Jens Peter Andersen (Aarhus, Denmark).

SR Membrane Preparation—SR vesicles were isolated from rabbit skeletal muscle according to de Meis and Hasselbach (29) and Champeil *et al.* (30). Before the preparation, the rabbits were subjected to a 48-h starvation diet (31).

Expression of WT and ADA SERCA1a Ca^{2+} -ATPase Species in Yeast, and Protein Estimation—The methods used for construction of expression plasmids, cultures, and preparation of membrane fractions were

described previously (20, 27). After SERCA expression in yeast, the light membrane fractions containing the expressed Ca^{2+} -ATPase were collected by differential centrifugation and stored in a medium containing 10 mM Hepes-Tris, pH 7.5, 0.3 M sucrose, and 0.1 mM CaCl_2 . Proteins were estimated by using the bicinchoninic acid procedure (32) in the presence of 0.1% SDS. The expressed Ca^{2+} -ATPase was quantified after SDS-PAGE by immunodetection, as described previously (20).

Purification of C-terminal His-tagged Ca^{2+} -ATPase—Purification of WT and ADA ATPases was as described previously (27), except that the second step in our original procedure (affinity chromatography step on a Reactive Red column) was omitted here. Minor changes were also made: (i) ADA Ca^{2+} -ATPase was solubilized with DDM at a detergent: protein ratio of 5:1 (w/w) instead of 3:1, (ii) after Ni^{2+} -NTA affinity chromatography the buffer of the pooled His-tagged Ca^{2+} -ATPase was exchanged, using a PD-10 device, with buffer of the following composition: 25 mM Mops-Tris, pH 7.0, 40% glycerol, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0.5 mg/ml DDM, 1 mM dithiothreitol, 0.1 M KCl, and 0.25 mg/ml of an egg yolk lipid suspension. The lipid suspension was made up of a 10:1 ratio (w/w) of L- α -phosphatidylcholine (EYPC) and phosphatidic acid (EYPA), the resulting vesicles being homogenized to a size of 100–300 nm by passing the suspension through a filter device (Avestin, Hamilton) calibrated to 100 nm (33). The lipid concentration in the PD-10 pool was increased to 1 mg/ml by using the same EYPC-EYPA suspension, and DDM was then removed by adding 200 mg of Bio-beads per mg of detergent and gently stirring for 3 h. Aliquots of the purified fraction were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Purity was checked on 8% gels by Laemmli-type SDS-PAGE (34), by Coomassie Blue staining after 1 h migration at 25 mA/gel, and quantitation of expressed Ca^{2+} -ATPase was performed with a GS-700 densitometer, using rabbit SR Ca^{2+} -ATPase as standard.

ATPase Activity Measurements—Spectrophotometric measurements of ATP hydrolysis by the Ca^{2+} -ATPase was routinely performed at 20°C with an ATP-regenerating coupled enzyme assay originally described by Pullman and co-workers (35) and subsequently adapted (36, 37). The reaction was performed in 2 ml of a medium containing 50 mM Tris-Tris, pH 7.0, 50 mM KNO_3 , 7 mM MgCl_2 , 1 mM phosphoenolpyruvate, 0.1 mg/ml pyruvate kinase, 0.1 mg/ml lactate dehydrogenase, an initial concentration of about 0.3 mM NADH, 3–6 $\mu\text{g/ml}$ purified Ca^{2+} -ATPase, and 0.1 mM total CaCl_2 . When needed, EGTA was added to yield the desired $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ (38), using a Ca^{2+} -EGTA apparent dissociation constant of about 0.5 μM in the presence of 7 mM MgCl_2 (0.4 μM in the absence of Mg^{2+} at pH 7.0). The reaction was initiated by addition of either 2 μM or 1 mM Na_2ATP , as indicated. When indicated, a solubilizing concentration of 1 mg/ml C_{12}E_8 was added to the ATPase assay medium. Measurements of ATPase activity performed in the context of inhibition by orthovanadate are described in the legend to Fig. H in the supplemental material (83, 84).

Fluorescence Measurements—Fluorescence measurements were performed with a Spex fluorolog instrument. Intrinsic fluorescence was measured with excitation and emission wavelengths of 290 and 330 nm and bandwidths of 2 and 20 nm, respectively, with about 5 $\mu\text{g/ml}$ only of purified and reconstituted WT or ADA Ca^{2+} -ATPase (or, again, SR vesicles). ATPase labeling with FITC and the subsequent FITC measurements were performed as described in the legend to Fig. D in the supplemental material.

Phosphorylation from ATP and P_i and Electrophoretic Separation After Phosphorylation—Phosphorylation from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ was measured at 20°C unless otherwise indicated, by adding 2 μM concentration of 2 mCi/ μmol $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ to WT or ADA mutated Ca^{2+} -ATPase at about 2 $\mu\text{g/ml}$ (about 1 μg per assay) in buffer A (50 mM Mops-Tris, pH 7.0 (20°C), 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2), supplemented with various concentrations of CaCl_2 (or of a Ca^{2+} /EGTA buffer). Phosphorylation measurements in the millisecond range were performed at 20°C with a rapid mixing and quenching apparatus. When indicated, ATPase phosphorylation was also measured in the same medium on ice, and dephosphorylation was subsequently triggered by adding 100 μM non-radioactive ATP, followed by acid quenching (see below). Phosphorylation from $[\text{P}_i\text{-}^{32}\text{P}]\text{P}_i$ was measured at 20°C by adding 100 μM concentration of 2 mCi/ μmol $[\text{P}_i\text{-}^{32}\text{P}]\text{P}_i$ to about 1 μg of WT or ADA Ca^{2+} -ATPase suspended in 100 μl of 100 mM Mops-Tris (pH 7.0), 20% Me_2SO , 20 mM MgCl_2 , 100 μM Ca^{2+} , and various concentrations of EGTA. The reaction was stopped by acid quenching with trichloroacetic acid and H_3PO_4 , added at final concentrations of 1 M and 67 mM, respectively. Handling of phosphorylated samples, electrophoretic separation using either Sarkadi-type gels (39) or Weber and Osborn gels (40), and final counting of radioactivity was performed essentially as described previously (39, 41, 42), with minor changes described under the supplemental material.

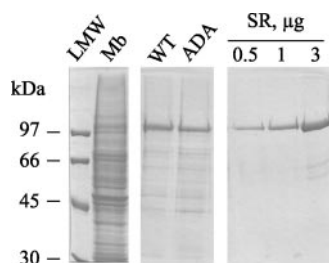


FIG. 1. Ni-NTA affinity purification of WT and ADA mutated Ca^{2+} -ATPases expressed in yeast. Purification was performed as described under "Experimental Procedures." After reconstitution into liposomes, about 2 μg of purified ATPase was loaded on an 8% polyacrylamide gel and separated by SDS-PAGE according to Laemmli (34). Gels were stained with Coomassie Blue after migration. Lane LMW, low molecular weight standard proteins with the indicated molecular weights. Lane Mb, yeast light membranes expressing about 2% WT Ca^{2+} -ATPase; lane WT, Ni-NTA purified WT Ca^{2+} -ATPase; lane ADA, Ni-NTA purified ADA-mutated Ca^{2+} -ATPase. Lanes SR, SR vesicles, as indicated.

Data Analysis—The SigmaPlot program (SPSS, Inc.) was used to prepare graphic representations of the data. The kinetic simulation software SimZyme (43, 44) was used to simulate the amount of phosphoenzyme formed as a function of time.

RESULTS

Purification and Reconstitution of wild-type (WT) and D813A,D818A (ADA) SERCA Ca^{2+} -ATPases Expressed in Yeast—WT and ADA-mutated Ca^{2+} -ATPases were expressed in yeast and purified by Ni-NTA affinity chromatography as recently described (27), except that the second affinity chromatography on a Reactive Red column was omitted, as the purity obtained after the first step was found sufficient for functional characterization of the purified enzymes. Starting from 400 mg of yeast, "light" membrane proteins containing 2% of expressed Ca^{2+} -ATPase (lane Mb in Fig. 1), about 0.6 mg of WT or ADA ATPases, was partially purified, to about 50–60% homogeneity (lanes WT and ADA in Fig. 1), and detergent removal allowed us to form lipid vesicles of 100 to 300 nm diameter containing the reconstituted proteins (as shown by freeze fracture electron microscopy, see Fig. A in the supplemental material (82), courtesy from Jean-Marc Verbavatz, CEA Saclay).

Ca^{2+} -dependent ATPase Activity of Reconstituted or C_{12}E_8 -solubilized WT and ADA-ATPases—In our previous work (19, 20), to measure the activity of expressed Ca^{2+} -ATPase, we found it necessary to add C_{12}E_8 at a solubilizing concentration to the ATPase assay medium, because this detergent reduced the background originating from contaminating ATPases or oxidases present in yeast membrane fractions. In the present work, as expressed SERCA was at least partially purified, the activity of reconstituted WT and ADA ATPases could be studied both in the presence and absence of detergent. In the presence of C_{12}E_8 (and at 20 °C), as can be seen from Fig. 2A, the WT enzyme (circles) and the ADA mutant (squares) displayed very different behaviors, as previously reported (20): the ADA mutant (squares) was only very weakly activated by increasing Ca^{2+} concentrations; activation by Ca^{2+} was also rather sluggish when DDM was used instead of C_{12}E_8 (not shown). In contrast, when ATPase measurements were performed in the absence of detergent, as shown in Fig. 2B, the ADA mutant now displayed full maximal velocity, with a K_m for Ca^{2+} of 1–2 μM , i.e. only moderately higher than that of WT ATPase, 0.3 μM (for WT ATPase, the K_m for Ca^{2+} was only slightly shifted toward higher affinity when detergent was omitted, as previously found for SR ATPase (36)). Similar results were obtained when the ATPase activity of the purified and reconstituted proteins was assayed with strontium (45, 46), as displayed in the inset of Fig. 2B: WT and ADA ATPases

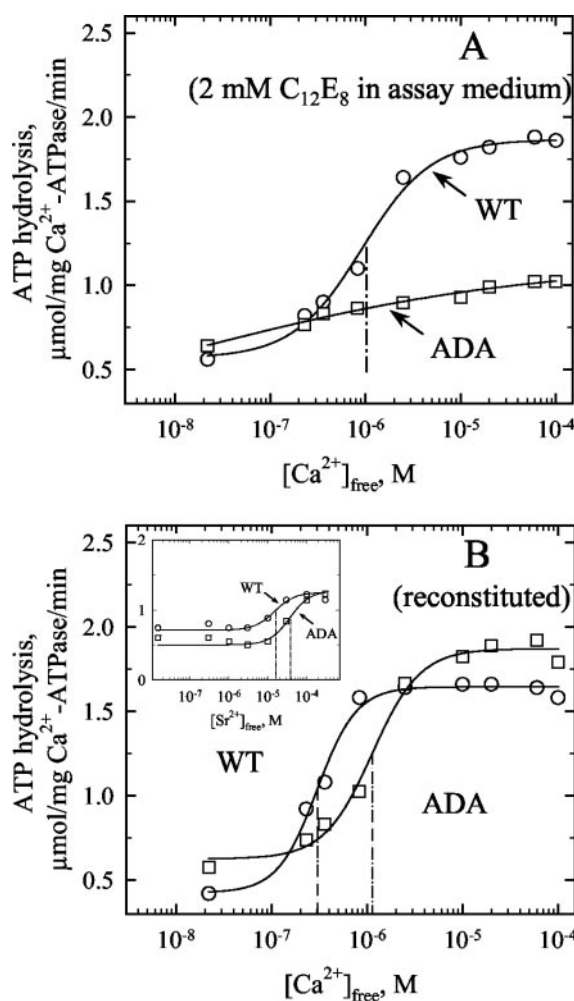


FIG. 2. Ca^{2+} -dependent ATPase activity of purified and reconstituted WT or ADA Ca^{2+} -ATPase, in the presence or absence of solubilizing concentrations of C_{12}E_8 (or DDM). A, the rates of ATP hydrolysis by purified and reconstituted WT (circles) or ADA (squares) Ca^{2+} -ATPase were measured as described under "Experimental Procedures" in the presence of a solubilizing concentration (2 mM) of C_{12}E_8 . B, conditions were as described in panel A, except that Ca^{2+} -dependent (or Sr^{2+} -dependent, for the inset) ATPase activity of purified and reconstituted WT or ADA Ca^{2+} -ATPase was measured without adding any detergent to the assay medium.

displayed K_m values for Sr^{2+} of 15 and 35 μM , respectively, showing that the shift in cation affinity for ADA compared with WT was the same for Ca^{2+} and Sr^{2+} . The data obtained in the absence of detergent (Fig. 2B) confirm the limited effect of the ADA mutation on the K_m for Ca^{2+} previously described by Zhang *et al.* (22) for ATPases expressed in COS cells membranes. Conversely, the poor sensitivity to Ca^{2+} of the hydrolytic activity of the ADA mutant in the presence of detergent, shown in Fig. 2A, shows that the functional properties of the ADA mutant are markedly affected by solubilization with C_{12}E_8 (see Supplemental Materials for additional comments on reconstitution and the effect of detergents).

Note that for both preparations, activities measured at very low free Ca^{2+} (and Sr^{2+}) concentrations were similar, and probably arose from residual protein contaminants. Note also that the maximal Ca^{2+} -dependent fraction of ATPase activity was about 1.2 μmol of ATP hydrolyzed per mg of protein/min, a V_{\max} 3–4 times lower than that of rabbit SR Ca^{2+} -ATPase (not shown): as previously discussed (27), this reduced V_{\max} probably derives from the fact that part of the ATPase experiences irreversible inactivation during purification, whereas the remaining fraction behaves in a normal way.

True Equilibrium Affinity for Ca^{2+} (or Sr^{2+}) of Unphosphorylated WT or ADA ATPase, as Revealed by the Conformational Changes Monitored by Intrinsic or Extrinsic Fluorescence—As a complement to the above ATPase measurements with the ADA mutant, which only reveal the *apparent* K_m for Ca^{2+} , we measured by an independent assay the *true equilibrium dissociation constant* (K_d) for Ca^{2+} of the ADA mutant, taking advantage of the relative purity of our reconstituted expressed ATPase to use intrinsic fluorescence to monitor Ca^{2+} -dependent changes (47), as was also recently done with WT purified SERCA1a Ca^{2+} -ATPase expressed with the Sf9/baculovirus system (48). Such measurements were performed at pH 7 in the absence of Mg^{2+} to maximize Ca^{2+} -dependent fluorescence changes (49). As shown in *panel A* of Fig. 3, starting from a situation where the total Ca^{2+} concentration in the fluorometer cuvette was $\sim 55 \mu\text{M}$ it was indeed possible to monitor both with WT and ADA ATPases, first the decrease in Trp fluorescence expected when calcium dissociation was triggered by the addition of excess EGTA, and then its recovery when the free Ca^{2+} concentration was subsequently raised by sequential additions of Ca^{2+} . For ADA ATPase, however, such recovery required higher Ca^{2+} concentrations. From the plot displayed in Fig. 3C, the K_d of WT Ca^{2+} -ATPase was estimated to be about $0.3 \mu\text{M}$, a value close to that of native SR in the same conditions ($0.4 \mu\text{M}$) and consistent with that reported previously at pH 7 in the absence of Mg^{2+} (50), whereas for the ADA mutant it was about $8 \mu\text{M}$, *i.e.* the K_d was 20 to 30 times higher. A similar shift in the affinity of ADA compared with WT was also found when Sr^{2+} instead of Ca^{2+} was added to the Ca^{2+} -free ATPases (Fig. 3B).

Note that the relatively small amplitude of the observed changes in Trp fluorescence observed for our partially purified preparations, about 2 *versus* 5–6% for native SR (not shown), is consistent with the above mentioned presence of protein contaminants and/or inactive ATPase in these preparations. It obviously makes the experiments difficult but the results shown in Fig. 3 were nevertheless nicely reproducible. In addition, the difference between WT and ADA traces, as well as other experiments (not shown) with fully inactive mutants, provides an internal control that contaminants play no role in these Ca^{2+} -dependent fluorescence signals, beyond reducing the relative amplitude of the observed ligand-dependent changes.

Additional experiments performed after labeling purified and reconstituted WT or ADA ATPases with FITC, an extrinsic label that covalently binds to lysine 515 in the nucleotide-binding domain of ATPase, made it possible to follow the conformational changes of the protein occurring in its cytosolic domain. FITC changes observed upon addition of Ca^{2+} confirmed the poorer affinity of ADA for Ca^{2+} , compared with WT (*panel A* in Fig. D of Supplemental Materials). Thus, the ADA mutation does shift the true K_d for Ca^{2+} binding, by a factor of 20 to 30, larger than the factor of about 3 by which the K_m deduced from steady-state ATPase activities is shifted. This is an indication of significant differences between the enzyme kinetics of the ADA mutant and WT enzymes.

P_i -dependent Trp Fluorescence Changes (and Vanadate-dependent FITC Fluorescence Changes) in WT or ADA ATPases, Phosphorylation from $^{32}\text{P}_i$, and Competition with Ca^{2+} —Conformational changes resulting from phosphorylation from inorganic phosphate in the absence of Ca^{2+} and the presence of 20% Me_2SO (at pH 7) were also monitored by intrinsic fluorescence. As shown in *panel A* of Fig. E in Supplemental Materials, sequential addition of P_i to the purified and reconstituted WT enzyme in its Ca^{2+} -free state increased the tryptophan fluorescence with a maximal amplitude about half of that obtained in the presence of saturating Ca^{2+} , in agreement with what was

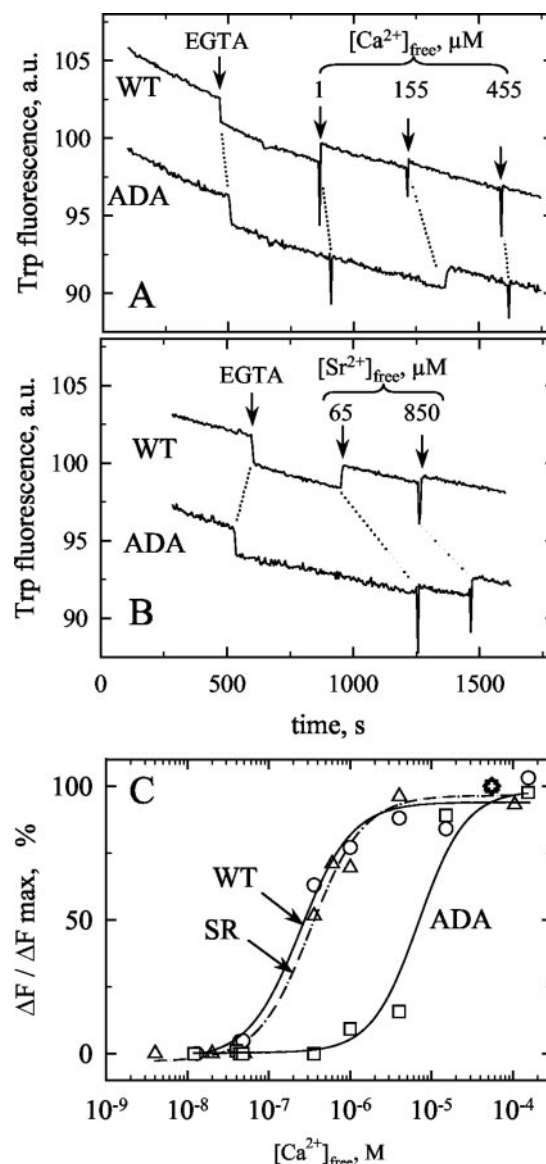


FIG. 3. Ca^{2+} or Sr^{2+} dependence of ATPase intrinsic fluorescence changes, and ATPase affinity for Ca^{2+} at equilibrium. A and B, tryptophan fluorescence changes upon calcium (A) or strontium (B) binding to WT or ADA mutated ATPase. Purified and reconstituted WT and ADA Ca^{2+} -ATPases were diluted 20 times into 150 mM Mops-Tris, pH 7.0, at 20 °C; the high buffer concentration was intended to minimize pH-dependent changes in the fluorescence of contaminant or inactivated proteins. Total Ca^{2+} was 55 μM , because of contaminating Ca^{2+} and Ca^{2+} added together with the enzyme. EGTA at a concentration of 500 μM was added first, to reduce the free Ca^{2+} concentration to 0.05 μM , and then successive additions of 300 μM CaCl_2 allowed to reach 1, 155, and 455 μM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$, as calculated using a $K_{d\text{Ca-EGTA}}$ of 0.4 μM . The fluorescence levels of WT and ADA ATPases have been expressed as percent of their initial value, and slightly shifted with respect to each other for clarity. The very small changes (typically 0.1–0.2%) because of dilution were corrected. Ligand additions (sometimes underlined by large changes because of interception of the excitation beam by the pipette cone) were the same for WT and ADA ATPases, as indicated by the dotted lines. C, Ca^{2+} -dependence of the normalized fluorescence changes. The ligand-induced fluorescence changes of WT (circles) and ADA (squares) were plotted considering as 100% (diamond) the difference (about 2%) between the initial fluorescence level in the presence of 55 μM Ca^{2+} and that in the presence of excess EGTA (these levels were corrected for the drift, observed because of photolysis and inactivation). Results obtained with SR Ca^{2+} -ATPase (triangles) are also plotted (in this case the above difference is larger, about 5–6%). Despite the absence of Mg^{2+} in the fluorescence assay (*panel C*) and its presence in the hydrolytic activity assay (Fig. 2B), the K_d for the fluorescence change in ADA (8 μM) is significantly higher than the K_m in the ATPase assay (1–2 μM): this simply reflects the difference between equilibrium and turnover conditions.

originally reported for the native enzyme (51). ADA underwent similar fluorescence changes upon binding of inorganic phosphate, indicating that the apparent affinity with which P_i raises tryptophan fluorescence was not modified much by the mutation ($\text{P}_{i/2}$ was roughly estimated to 30–40 μM in both cases). After labeling with FITC, both WT and ADA ATPases in the absence of Ca^{2+} also responded to the addition of orthovanadate in the expected (52) manner (*panel B* of Fig. D in Supplemental Materials), indicating that in response to this ligand both Ca^{2+} -free ATPases undergo the same conformational changes in the cytosolic region.

We also measured phosphorylation of the purified and reconstituted WT and ADA ATPases directly, using $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{P}_i$, as well as competition of Ca^{2+} with this phosphorylation. Results are displayed in *panels B* and *C* of Fig. E in Supplemental Materials. For WT, the concentration of calcium for half-inhibition of phosphorylation from P_i was about 2 μM , consistent with previous data (20, 53) and slightly higher than the true K_d for Ca^{2+} , as expected because of the competition of phosphorylation from P_i with calcium binding. For ADA, half-inhibition required 35–40 μM Ca^{2+} , *i.e.* a calcium concentration about 20 times higher than for WT, consistent with extrapolation of previous results with a triple mutant (24) and with all the above evidence for a lower affinity of ADA ATPase for Ca^{2+} . These measurements of P_i -derived phosphorylation data in the absence of Ca^{2+} therefore do not reveal any clear implication of the L6–7 loop in the events occurring at the phosphorylation site in the cytosolic domain of Ca^{2+} -free ATPase.

Limited Activation of ADA ATPase at Low ATP Concentration—To understand the puzzling discrepancy between the full ATPase activity of the detergent-free ADA mutant and its previously demonstrated (20, 22, 24) reduced ability for phosphorylation from ATP, we then reinvestigated the ability of the purified and reconstituted ATPases to become phosphorylated from ATP at various calcium concentrations, using an ATP concentration (2 μM) low enough to minimize background noise. *Panels A* and *B* in Fig. 4 show that under these conditions, the apparent $[\text{Ca}]_{1/2}$ for calcium activation of phosphorylation of WT was again submicromolar, as expected (here, $\sim 0.7 \mu\text{M}$). There was also a slight further increase in phosphorylation at millimolar concentrations of Ca^{2+} , probably because of CaATP replacing MgATP at the catalytic site, as described previously (20, 54, 55). For ADA, the amount of phosphoenzyme formed from ATP at submillimolar Ca^{2+} concentrations remained low, about 20–25% of that of WT, and the apparent $[\text{Ca}]_{1/2}$ for its formation was roughly estimated to be 30 μM . As in our previous experiments (Figs. 3A and 4A in Ref. 20), the phosphorylation level increased further at higher (millimolar) Ca^{2+} concentrations, approaching the same level as for WT ATPase. In our previous experiments, we had estimated that the small amount of phosphoenzyme formed at submillimolar Ca^{2+} concentrations was not significant (Figs. 3A and 4A in Ref. 20); however, because of the above demonstration in Fig. 3 of the ability of ADA to bind submillimolar concentrations of Ca^{2+} , we now believe that this small amount is indicative of the turnover properties of the ADA mutant, whereas the higher phosphorylation level found at very high Ca^{2+} concentrations, as for WT ATPase, is again because of replacement of MgATP by CaATP at the catalytic site. This conclusion was confirmed by time-resolved experiments that showed that dephosphorylation of both ADA and WT was slower following an initial phosphorylation at a high Ca^{2+} concentration than following an initial phosphorylation at an intermediate submillimolar Ca^{2+} concentration (Fig. F in Supplemental Materials).

We then realized that very different concentrations of ATP were employed in the phosphorylation assay and the ATPase

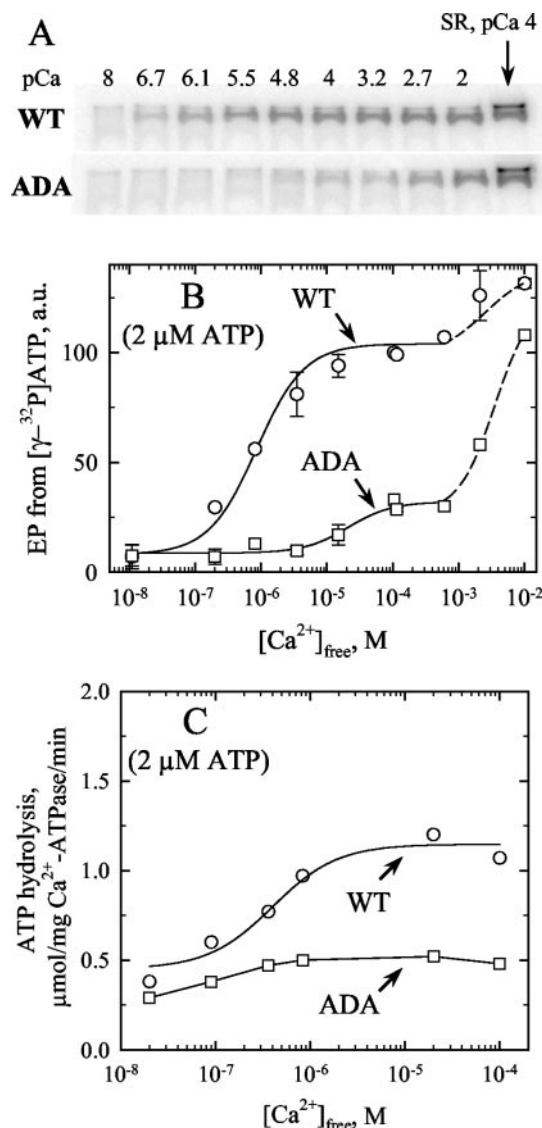


FIG. 4. Limited activation of ADA ATPase at low ATP concentrations. *A* and *B*, steady-state Ca^{2+} -dependent phosphorylation from ATP of WT and ADA ATPases. WT (circles) or ADA (squares) was incubated in buffer A with 2 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ at 20 °C at the indicated Ca^{2+} -free concentrations, as detailed under “Experimental Procedures.” Samples were acid-quenched after 15 s of incubation, and radioactivity was quantified after electrophoretic separation, using a PhosphorImager. The last lane in *panel A* shows the moderately higher (about twice higher) phosphorylation level of a comparable amount of SR ATPase at pCa 4: again this indicates that both WT and ADA ATPases are only partially active. *C*, ATP hydrolysis by WT and ADA ATPases at the same low ATP concentration. Here, the ATPase activity of WT (circles) and ADA (squares) was measured in Buffer A with the ATP-regenerating coupled enzyme system, in the presence of 2 μM Na_2ATP only. For comparison, controls were performed in the presence of 1 mM ATP, as in Fig. 2B (data not shown).

activity assay, 2 μM versus 1 mM. We therefore checked the effect of a low ATP concentration on the hydrolytic activity of ADA ATPase. As displayed in Fig. 4C, for WT ATPase at 2 μM ATP, the V_{max} of ATP hydrolysis was 0.7 μmol of ATP hydrolyzed per mg of Ca^{2+} -ATPase/min, close to 70% of the V_{max} measured at 1 mM ATP, and the K_m for calcium activation was about 0.4 μM , close to the value estimated at the higher ATP concentration (Fig. 2B). In contrast, for the ADA mutant at 2 μM ATP, the V_{max} for Ca^{2+} dependent activity was much lower, about 0.2 μmol of ATP hydrolyzed per mg of Ca^{2+} -ATPase/min, corresponding to only 20% to that of the WT. Activation by Ca^{2+} of the ATPase activity of ADA was thus dramatically

reduced compared with that measured at high ATP concentrations, a behavior similar to what was observed above in Fig. 2A at high ATP but in the presence of C_{12}E_8 .

ADA ATPase Is Stabilized in E2 at a Low ATP Concentration, Mainly Because of a Reduced E2 to $\text{Ca}_2\text{E1}$ Transition and an Acceleration of Dephosphorylation—The above described combination, at low ATP concentrations, of a low hydrolytic activity and a low steady state phosphorylation for ADA ATPase would be consistent with accumulation at steady-state of the dephosphorylated E2 form of this mutant. A possible reason for such an accumulation would be the slowing down of the Ca^{2+} -induced transition from the unphosphorylated E2 to the $\text{Ca}_2\text{E1}$ form, as previously suggested for the D813N,D815N,D818N cluster mutant (24) and the D813L single mutant (56). If so, the E2 to E1 transition could indeed become rate-limiting at low ATP concentrations, whereas this would not necessarily be the case at high ATP concentrations, as the E2 to $\text{Ca}_2\text{E1}$ transition has been shown to be accelerated by bound ATP (57–62). We have evaluated the validity of this hypothesis by checking whether the phosphorylation level of the ADA mutant at a low ATP concentration and a moderate Ca^{2+} concentration can transiently reach a higher value during pre-steady state (starting from Ca^{2+} -saturated ATPase) than during steady state. Fig. 5A illustrates such experiments, performed on a subsecond time scale at 20 °C. For the WT enzyme, a maximal phosphorylation level was reached within about 0.1 s, and then this level remained essentially constant during the time course of the experiment. In contrast, the ADA enzyme displayed an overshoot in phosphorylation, attaining a maximal level corresponding to about 40% of that of the WT enzyme and then declining to a level of 20–25% of WT, after 0.6 s.

When we also monitored the rate of dephosphorylation of ATPase by a chase with unlabeled ATP (on ice, Fig. 5B), dephosphorylation of the ADA mutant was moderately enhanced compared with WT, being about three times faster. Such acceleration of dephosphorylation will also reduce the transient overshoot in phosphorylation, as well as favor accumulation of E2 during steady-state catalysis. Computer simulation of the transient phosphorylation experiment illustrated in panel A was carried out with the SimZyme software (63), reducing the ATPase cycle to a simple three-species cycle with no reverse reactions: $\text{E2} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E1} \rightarrow \Sigma\text{EP} \rightarrow \text{E2}$. An additional constraint placed on these simulations was that steady-state ATP hydrolysis by ADA was requested to remain significantly below that of WT ATPase, at the low ATP concentration used (Fig. 4C). The best values obtained for the rate constants of the three transitions for WT were 20, 14, and 4 s^{-1} , respectively, reasonably consistent with those (25, 35, and 5 s^{-1}) calculated from the same kind of experiments performed at $5\text{ }\mu\text{M}$ ATP with Ca^{2+} -ATPase expressed in COS cells (63). Values obtained for ADA were 1.4, 6, and 10 s^{-1} , suggesting indeed that the $\text{E2} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E1}$ reaction step in ADA is slowed down more than 10-fold compared with WT, whereas the rate of dephosphorylation $\Sigma\text{EP} \rightarrow \text{E2}$ increases 2–3-fold and the rate of phosphorylation $\text{Ca}_2\text{E1} \rightarrow \Sigma\text{EP}$ drops by about 2-fold. The two latter changes in rates, as well as our use of a low ATP concentration that makes phosphorylation slow, contribute to making the overshoot less apparent in our experiment than, for instance, for the recently described single mutants K758I in M5 (63, 64) or D813L in L6–7 (56). Note that in the present time-resolved experiments, we found no evidence for the strong (33-fold) reduction in the rate of phosphorylation from ATP considered to best fit the data in Ref. 24: in our case, the phosphorylation rate was at most reduced by a factor of 2–3 (Fig. 5A).

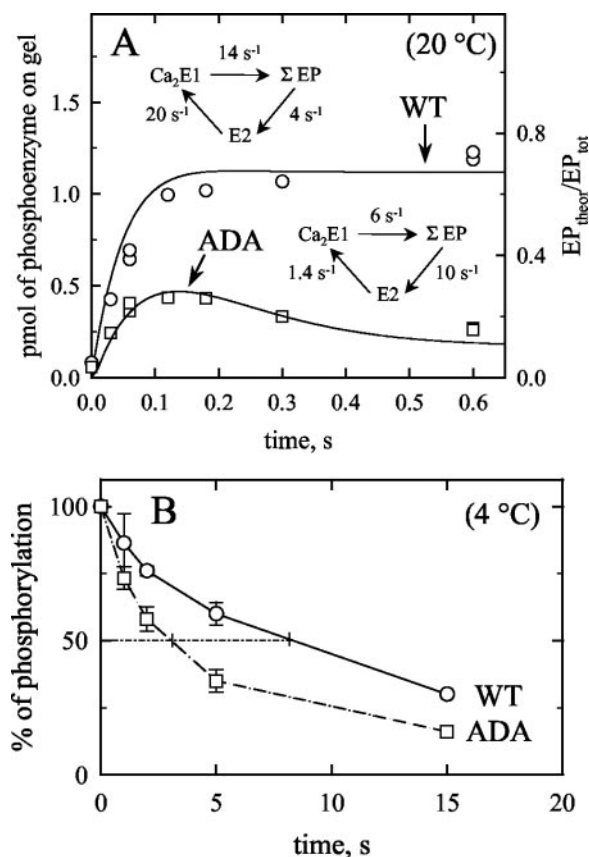


FIG. 5. Rates of phosphorylation and dephosphorylation from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. A, transient overshoot in phosphorylation at low ATP concentrations, as deduced from fast kinetics experiments. WT (circles) or ADA (squares) ATPase was incubated at $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ in buffer A, supplemented with calcium and EGTA to reach $150\text{ }\mu\text{M}$ free Ca^{2+} . ATPase phosphorylation was then triggered by vol/vol mixing with buffer A supplemented with $4\text{ }\mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ as well as calcium and EGTA (again to reach $150\text{ }\mu\text{M}$ free Ca^{2+}). The reaction was carried out at 20 °C and then stopped at the indicated times by acid quenching, using a rapid mixing and quenching equipment. Proteins were then separated by electrophoresis as detailed under “Experimental Procedures” and phosphoenzyme formation was detected by autoradiography. The ^{32}P radioactivity counted for the various lanes was corrected for slight differences in the amount of protein layered on these lanes (as revealed by Coomassie Blue staining after migration, not shown). Solid lines correspond to simulation with SimZyme of a three-species scheme; the rate constants used to simulate the various reactions, $\text{E2} \rightarrow \text{Ca}_2\text{E1}$, $\text{Ca}_2\text{E1} \rightarrow \Sigma\text{EP}$, and $\Sigma\text{EP} \rightarrow \text{E2}$, are indicated as insets (backward rates were set to zero). B, kinetics of phosphoenzyme overall decay. Phosphorylation of WT (circles) or ADA (squares) ATPase was first carried out, on ice, with $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ ADA or WT ATPase incubated in buffer A supplemented with calcium, EGTA (to reach $120\text{ }\mu\text{M}$ free Ca^{2+}), and $2\text{ }\mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. After 15 s of reaction, $100\text{ }\mu\text{M}$ non-radioactive ATP was added to the solution and the reaction was stopped by acid quenching after various periods of time. Radioactivity was quantified as in panel A, the amount of phosphoenzyme present at the end of the 15-s phosphorylation period being taken as 100%. Data are average values corresponding to three independent experiments.

ADA ATPase Sensitivity to Orthovanadate during Turnover at High ATP Concentration Also Reveals Increased Accumulation of E2—We then asked whether accumulation of the E2 form of ATPase during steady-state turnover, shown above to occur in the presence of $2\text{ }\mu\text{M}$ ATP, also occurs in the presence of a high (1 mM) ATP concentration. To address this question we used the classical procedure of evaluating to what extent ADA turnover is inhibited by orthovanadate, an inhibitor thought to react only with the E2 form of ATPases (e.g. Ref. 65). We therefore measured the ATPase hydrolytic activity in the presence of increasing concentrations of vanadate. Note that because of the high concentrations of orthovanadate required

for this inhibition, these measurements were performed using a phosphomolybdate colorimetric assay of ATPase activity, and not the usual coupled enzyme assay: this made it possible to avoid artifactual stimulation by vanadate of NADH oxidation, a stimulation that occurs at submillimolar concentrations of vanadate independently of the presence of any hydrolytic activity (66–68) (see also Fig. G in Supplemental Materials). Fig. H in Supplemental Materials shows that the EC_{50} for inhibition of ATPase turnover by orthovanadate in the presence of 1 mM MgATP was about 20-fold lower for ADA than for WT ATPase (about 4 *versus* about 70 μM), consistent with a higher proportion of the E2 form during steady-state cycling of the ADA mutant, compared with WT.

A prerequisite, however, for accepting this conclusion, is that the true affinity of E2 for orthovanadate is the same in WT and ADA ATPases. To address this question we took advantage of the fact that upon dilution of previously inhibited Ca^{2+} -ATPase, bound vanadate is released fairly slowly, namely over a few minutes (52, 69, 70), as was checked in preliminary experiments (see Fig. I in Supplemental Materials). We then preincubated Ca^{2+} -free ATPase in the presence of various concentrations of orthovanadate for more than 1 h, to allow for equilibration with vanadate, and deduced the proportion of uninhibited ATPase from the rate of ATP hydrolysis observed during the first 30 s after 20-fold dilution of the ATPase into a standard coupled-enzyme assay medium. Panel B in Fig. H of Supplemental Materials shows that WT and ADA ATPases were inhibited by vanadate with about the same EC_{50} (about 2 μM), confirming that the higher sensitivity of ADA turnover to vanadate illustrated in panel A of the same figure probably did arise from a larger proportion of E2 present during turnover, and not from a different intrinsic affinity for vanadate.

The ADA Mutation Reduces Affinity for ATP at Equilibrium—The fact that ADA at a high ATP concentration has an almost unaltered V_{max} (Fig. 2B) implies that a high ATP concentration at least partially compensates for the slowing down of the E2 to $\text{Ca}_2\text{E1}$ transition, so that the rate of this transition is no longer rate-limiting (the transition is, nevertheless, likely to remain slower in ADA than in WT also at high ATP concentrations, as ADA is more sensitive than WT to inhibition by vanadate). The question remains whether ATP, by binding to the E2 conformation of ADA ATPase, stimulates the (intrinsically slow) rate of its transition to the $\text{Ca}_2\text{E1}$ form with the same nucleotide binding affinity as it does in WT.

To directly estimate the equilibrium true affinity of ADA ATPase for ATP in the absence of Ca^{2+} , we again monitored the Trp fluorescence of purified and reconstituted ATPases, as was done previously for SR vesicles (71). The results are shown in Fig. 6, in which panel A illustrates control measurements done with SR vesicles, and panel B the measurements with WT and ADA ATPases. Although the amplitudes of the ATP-induced changes were not much larger than the noise level in these measurements, it is clearly seen that for the ADA mutant, experiencing a perceptible conformational change required higher concentrations of ATP than for WT ATPase (55 μM instead of 5 μM ATP). The K_d of ATP binding to WT ATPase was roughly estimated to be about 2–4 μM under these conditions, similar to that for SR itself, whereas for the ADA mutant it was obviously larger, probably above 20 μM .

At this step, it may be relevant to point out that the rate of ADA phosphorylation from ATP that we deduced from the analysis of our pre-steady state experiment was moderately slower than that for WT (inset to Fig. 5A). Experimentally, a similar slowing down was also found by Zhang *et al.* (24). Although the above estimated K_d values for ATP refer to ATP binding in the absence of Ca^{2+} , a similar reduction in affinity

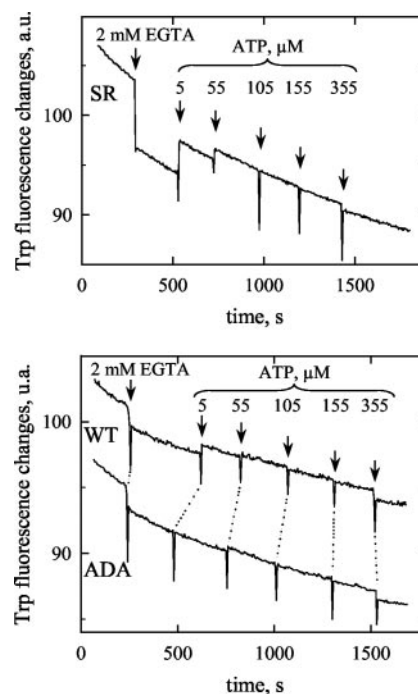


FIG. 6. Fluorescence changes upon addition of ATP to SR vesicles or reconstituted WT or ADA ATPase: loss of “true” affinity for ATP binding to Ca^{2+} -free ADA enzyme. Tryptophan fluorescence changes upon addition of ATP were monitored. For the panel A experiment, SR vesicles (at 0.1 mg/ml), and for the panel B experiment, reconstituted WT (0.16 mg/ml) or ADA (0.2 mg/ml) ATPase were diluted 20-fold into 150 mM Mops-Tris, pH 7.0 (20 °C), and 5 mM MgCl_2 . Total Ca^{2+} concentration was adjusted to 55 μM , taking into account contaminating Ca^{2+} and Ca^{2+} added together with the enzyme. After an initial addition of 2 mM EGTA, various amounts of ATP were sequentially added, to reach final concentrations of 5, 55, 105, 155, and 355 μM . Each addition implied dilution by 0.1 or 0.2%, which has been corrected in the figure. Because the excitation wavelength for tryptophan fluorescence was here kept at 290 nm, addition of the highest concentration of ATP gives rise to a significant inner filter effect, which can be clearly seen but, however, remains very small or even negligible for the smallest concentrations.

might also apply to the binding of ATP to ADA in the presence of Ca^{2+} , and this could be responsible in part for the observed reduction in the phosphorylation rate.

DISCUSSION

Detergent Sensitivity, the Reason for Previous Discrepancies about ADA ATPase—The importance of the L6–7 loop in the function of SERCA1a Ca^{2+} -ATPase was initially revealed by the fact that replacing aspartic acid residues 813 and 818 by alanine reduced Ca^{2+} -dependent ATPase activity very significantly under the assay conditions used: the ADA-mutated enzyme displayed a very low ATPase activity, amounting to only about 10% of that for WT ATPase (Fig. 5 in Ref. 19 and Fig. 2 in Ref. 20). At that time, as we were working with yeast microsomal membranes, we found it necessary to add a solubilizing concentration of C_{12}E_8 to the medium during the activity measurements, to suppress the nonspecific hydrolytic activity arising from other proteins present in yeast membranes (this nonspecific activity was making it difficult to unambiguously attribute the small Ca^{2+} dependent activity, amounting to about 2% of the total activity in the absence of detergent, to expressed SERCA1a). The same ADA mutant enzyme, expressed in COS cells was, however, later reported by Zhang *et al.* (22) to display significant Ca^{2+} -dependent ATPase activity, up to about 30% of that of the WT enzyme, a level of activity that was detected without any detergent added to the medium (Fig. 4D in Ref. 22). In the same work, the mutation was also

reported to reduce the apparent affinity for calcium, but only to a moderate extent, suggesting for ADA a much better sensitivity to calcium than the millimolar sensitivity that we had described previously on the basis of phosphorylation experiments; only a moderate reduction was found for the related triple, but more conservative (Asp to Asn) mutant, D813N,D815N,D818N (24).

These experimental discrepancies find here a satisfactory explanation, as we demonstrate that after purification and reconstitution into lipids, the ADA enzyme displays almost the same maximal velocity and apparent affinity for Ca^{2+} as the WT ATPase when activity is measured in the absence of detergent and at a high ATP concentration. In contrast, when activity is tested in the presence of solubilizing concentrations of detergent, the purified mutant displays the same low ATPase activity and very poor apparent affinity for Ca^{2+} as we have described previously. There is therefore no contradiction between the results obtained with yeast-expressed or COS-expressed ATPase.

Inhibition by detergent of the ADA ATPase activity seems to be of a reversible nature, as the final reconstituted preparation retains activity despite the 18-h incubation in the solubilized state imposed by the purification procedure. As the ADA mutant also seems to be more sensitive than WT to detergent concentrations lower than the critical micellar concentration (see Fig. C in Supplemental Materials, and Refs. 72–75 for a general description of ATPase perturbation by non-solubilizing concentrations of detergents), it is likely that the normal function of the L6–7 loop is somehow influenced by the lipid-water interface, for instance, because the negative charges at the N-terminal end of the L6–7 loop (those that are lost in the ADA mutant) together with the positive charges at the other end of the loop are engaged in dipolar interactions within the phospholipid polar head group region. Interestingly, the replacement of acidic residues of the L6–7 loop of the Na^+,K^+ -ATPase by alanine residues was recently reported to make the mutant more labile during extraction by SDS (25).

The ADA Mutation Significantly Reduces the K_d for Ca^{2+} or Sr^{2+} Equilibrium Binding, and Slows Down the E_2 to Ca_2E_1 Transition, but These Impairments Are Partially Overcome by High ATP Concentrations—By monitoring the intrinsic or extrinsic fluorescence of purified and reconstituted ATPases in the presence of various Ca^{2+} concentrations (Fig. 3 and Fig. D under Supplemental Materials) we were able to measure the affinity for Ca^{2+} binding at equilibrium in the absence of nucleotide. It should be realized that for a mutant with reduced equilibrium affinity, indirect fluorescence measurements are in a sense more suitable than the direct $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding measurements reported in Refs. 22 and 24, because at the present stage unfavorable signal to noise ratios prevent the latter measurements from being extended beyond 3–10 μM Ca^{2+} (76). Our result that calcium binding to the ADA enzyme occurs with a K_d 20- or 30-fold higher than that for the WT enzyme (being shifted from a submicromolar value up to about 10 μM at pH 7 in the absence of Mg^{2+}) is, nevertheless, nicely consistent with the single measurement at 3 μM $^{45}\text{Ca}^{2+}$ reported in Ref. 22; an even poorer ability to bind $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was found for the D813N,D815N,D818N triple mutant (Table II in Ref. 24). Such a shift has to be taken into account (which was not the case in Ref. 24) in kinetic schemes that aim at describing the behavior of such mutants.

The 20- or 30-fold difference shown here in K_d values for Ca^{2+} binding at equilibrium (Fig. 3C) is much more pronounced than the 3-fold difference in K_m values found for Ca^{2+} activation of ATPase at high ATP concentrations (Fig. 2B). However, K_m is recognized not to be a reliable indicator of

equilibrium binding affinities (see Refs. 44 and 77, for examples). In fact, both this less pronounced difference in K_m values at millimolar ATP than in K_d values at equilibrium and the poor ability of ADA ATPase to become activated by micromolar ATP at submillimolar Ca^{2+} concentrations (Fig. 4) can be easily understood on the basis of the reduced transition rate between the Ca^{2+} -free E_2 and the Ca^{2+} -bound E_1 forms of ADA ATPase (Fig. 5A and Refs. 24 and 56): the slowed down transition becomes rate-limiting in ADA ATPase at low levels of ATP, whereas this is no longer the case at high ATP concentrations, where this transition is greatly accelerated by ATP binding, as it is for WT ATPase (57, 59, 60, 62, 78, 79). In other words, a high ATP concentration partially overcomes the major functional deficiency of the mutation, namely the reduction in rate of the E_2 to Ca_2E_1 transition, whereas in the absence of ATP, the slower transition rate will result in a definite decrease in the affinity with which Ca^{2+} binds at equilibrium.

Further Consequences of the ADA Mutation on the Cycle—Some of our early results about the major role played by the L6–7 loop in ATPase activation by Ca^{2+} have advocated a direct role of Asp⁸¹³, Asp⁸¹⁵, and Asp⁸¹⁸ in the initial binding of Ca^{2+} , perhaps as an entrance gate, a hypothesis explored further in direct metal binding experiments (19–21) and adopted in an *in silico* study (25). However, from a kinetic point of view the rate of the E_2 to Ca_2E_1 transition is generally thought to be rate-limited not by Ca^{2+} binding *per se* but by a conformational transition occurring either after binding of the first Ca^{2+} ion (78), or, alternatively *before* binding of Ca^{2+} , an event accompanied by deocclusion of intramembraneous protons bound to the translocation sites in the E_2 state (80, 81). Thus, the slowing down of the E_2 to Ca_2E_1 transition in ADA ATPase seems to favor an indirect effect of the mutation, as further discussed below.

As regards the effect of the mutation on other steps in the cycle we found that the ADA mutation leaves the affinity for phosphorylation from P_i almost unaltered (see Fig. E in Supplemental Materials) and only moderately slows down phosphorylation from ATP (as opposed to simulations in Ref. 24; note also that phosphorylation of the single D813L mutant in Ref. 56 is even faster than that of WT). In contrast, the ADA mutation moderately increases the rate of ATPase dephosphorylation after its phosphorylation from ATP (Fig. 5), presumably by accelerating the Ca_2E_1P to $E_2\text{P}$ transition. Moreover, the ADA mutation causes a reduction in the affinity with which MgATP binds to ATPase in the absence of Ca^{2+} (Fig. 6B). Thus, we obtained positive evidence that the mutation of the L6–7 loop affects other steps in the ATPase cycle, beyond the E_2 to Ca_2E_1 transition, and also influences processes such as binding of nucleotide by the cytosolic domain, far away from the Ca^{2+} -binding sites. The present data are therefore not only consistent with, but also experimentally support the general hypothesis raised in Refs. 14 and 24 that the L6–7 loop plays an important role in coordinating events in the transmembrane and cytosolic domains.

A Specific Hypothesis for a Role of the L6–7 Loop in the E_2 to Ca_2E_1 Transition—At the molecular level, a possible interpretation for the present findings is that the effect of the ADA mutation in L6–7 on the E_2 to Ca_2E_1 transition could be exerted via an effect transmitted to the M6 helix, which contributes several liganding amino acid residues for Ca^{2+} binding. From the crystal structures it has been concluded that the conversion of Ca_2E_1 to E_2 is accompanied by a rotation of M6 in a clockwise direction, resulting in mispositioning of the Ca^{2+} -liganding residues (15). We shall refer to these conformational changes accompanying Ca^{2+} dissociation and association as unwinding and re-winding of the M6 helix, respectively. We

propose that winding and unwinding events could be affected by the mutations in L6–7, for instance, via changes that would lead to pK changes of the carboxyls in site 1 (e.g. that of Asp⁸⁰⁰). Thus, stronger binding of intramembraneously occluded protons could slow down deprotonation during the E2 to Ca₂E1 transition rate, whereas reprotonation during the Ca₂E1P to E2P transition could be accelerated, consistent with our experimental observations. The destabilizing effect of detergent in the ADA mutant would also make sense, as the link between the loop and M6 traverses the polar head group region of the lipid bilayer. With such speculations in mind, future studies of the ADA mutant at different pH values will therefore be of interest.

Acknowledgments—We thank Cedric Montigny for technical help, Dr. Jean-Marc Verbavatz for the freeze fracture electron microscopy, Dr. M. Garrigos (LTMD, CEA Saclay, France) for introducing us to the P_i colorimetric measurements in multiwell microtiter plates, Prof. J. P. Andersen for the gift of SimZyme software, Dr. J.-M. Neumann (LBPM, CEA Saclay, France) for comments about the structure of the L6–7 region, and Dr. E. Mintz (CEA Grenoble, France), Dr. B. de Foresta (LTMD, CEA Saclay, France), and Dr. J.-J. Lacapère (Inserm U410 Unit) for critical discussions and reading of the manuscript. One of our reviewers is also specifically thanked for his encouragement to develop a unified presentation of our conclusions, previously scattered throughout discussion.

REFERENCES

- Hasselbach, W., and Makinose, M. (1961) *Biochem. Z.* **333**, 518–528
- Ebashi, S., and Lipman, F. (1962) *J. Cell Biol.* **14**, 389–400
- MacLennan, D. H. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 4508–4518
- Mintz, E., and Guillain, F. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 52–70
- MacLennan, D. H., Rice, W. J., and Green, N. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28815–28818
- Møller, J. V., Juul, B., and le Maire, M. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1286**, 1–51
- Makinose, M. (1973) *FEBS Lett.* **37**, 140–143
- de Meis, L., and Vianna, A. L. (1979) *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 275–292
- Champeil, P. (1996) in *Biomembranes, ATPases* (Lee, A. G., ed) Vol. 5, pp. 43–76, JAI Press, London
- Scarborough, G. A. (2002) *J. Bioenerg. Biomembr.* **34**, 235–250
- MacLennan, D. H., Brandl, C. J., Korczak, B., and Green, N. M. (1985) *Nature* **316**, 696–700
- Zhang, P., Toyoshima, C., Yonekura, K., Green, N. M., and Stokes, D. L. (1998) *Nature* **392**, 835–839
- Dux, L., Pikula, S., Mullner, N., and Martonosi, A. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 6439–6442
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000) *Nature* **405**, 647–655
- Toyoshima, C., and Nomura, H. (2002) *Nature* **418**, 605–611
- Martonosi, A. N., and Pikula, S. (2003) *Acta Biochim. Pol.* **50**, 337–365
- Clarke, D. M., Loo, T. W., Inesi, G., and MacLennan, D. H. (1989) *Nature* **339**, 476–478
- Andersen, J. P. (1995) *Biosci. Rep.* **15**, 243–261
- Falson, P., Menguy, T., Corre, F., Bouneau, L., de Gracia, A. G., Soulié, S., Centeno, F., Møller, J. V., Champeil, P., and le Maire, M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17258–17262
- Menguy, T., Corre, F., Bouneau, L., Deschamps, S., Møller, J. V., Champeil, P., le Maire, M., and Falson, P. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 20134–20143
- Menguy, T., Corre, F., Juul, B., Bouneau, L., Lafitte, D., Derrick, P. J., Sharma, P. S., Falson, P., Levine, B. A., Møller, J. V., and le Maire, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13016–13028
- Zhang, Z., Lewis, D., Strock, C., Inesi, G., Nakasako, M., Nomura, H., and Toyoshima, C. (2000) *Biochemistry* **39**, 8758–8767
- Costa, V., and Carloni, P. (2003) *Proteins* **50**, 104–113
- Zhang, Z., Lewis, D., Sumbilla, C., Inesi, G., and Toyoshima, C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 15232–15239
- Xu, G., Farley, R. A., Kane, D. J., and Fallor, L. D. (2003) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **986**, 96–100
- Falson, P., Lenoir, G., Menguy, T., Corre, F., Montigny, C., Pedersen, P. A., Thines, D., and le Maire, M. (2003) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **986**, 312–314
- Lenoir, G., Menguy, T., Corre, F., Montigny, C., Pedersen, P. A., Thines, D., le Maire, M., and Falson, P. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1560**, 67–83
- Lenoir, G., Montigny, C., le Maire, M., and Falson, P. (2003) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **986**, 333–334
- de Meis, L., and Hasselbach, W. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 4759–4763
- Champeil, P., Guillain, F., Venien, C., and Gingold, M. P. (1985) *Biochemistry* **24**, 69–81
- Cuenda, A., Henao, F., Nogues, M., and Gutierrez-Merino, C. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1194**, 35–43
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) *Anal. Biochem.* **150**, 76–85
- MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Mencho, B. P., Takeshita, K., Subbarao, N. K., and Hu, L. R. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1061**, 297–303
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
- Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A., and Racker, E. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 3322–3329
- Møller, J. V., Lind, K. E., and Andersen, J. P. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 1912–1920
- Lund, S., Orlowski, S., de Foresta, B., Champeil, P., le Maire, M., and Møller, J. V. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 4907–4915
- Tsien, R., and Pozzan, T. (1989) *Methods Enzymol.* **172**, 230–262
- Sarkadi, B., Enyedi, A., Foldes-Papp, Z., and Gardos, G. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 9552–9557
- Weber, K., and Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 4406–4412
- Menguy, T., Chenevois, S., Guillain, F., le Maire, M., Falson, P., and Champeil, P. (1998) *Anal. Biochem.* **264**, 141–148
- Lenoir, G., Picard, M., Gauron, C., Montigny, C., Le Marechal, P., Falson, P., le Maire, M., Møller, J. V., and Champeil, P. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 9156–9166
- Sørensen, T. L., and Andersen, J. P. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 28954–28961
- Andersen, J. P., Sørensen, T. L., Povlsen, K., and Vilsen, B. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 23312–23321
- Fujimori, T., and Jencks, W. P. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 18466–18474
- Orlowski, S., and Champeil, P. (1993) *FEBS Lett.* **328**, 296–300
- Dupont, Y., Guillain, F., and Lacapère, J.-J. (1988) *Methods Enzymol.* **157**, 206–219
- Miras, R., Cuillel, M., Catty, P., Guillain, F., and Mintz, E. (2001) *Protein Expr. Purif.* **22**, 299–306
- Guillain, F., Gingold, M. P., and Champeil, P. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7366–7371
- Forge, V., Mintz, E., and Guillain, F. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10953–10960
- Lacapère, J.-J., Gingold, M. P., Champeil, P., and Guillain, F. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 2302–2306
- Pick, U. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 6111–6119
- Andersen, J. P., and Vilsen, B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 15931–15936
- Orlowski, S., Lund, S., Møller, J. V., and Champeil, P. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 17576–17583
- Nakamura, Y. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 8183–8189
- Andersen, J. P., Clausen, J. D., Einholm, A. P., and Vilsen, B. (2003) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **986**, 72–81
- Carvalho, C. A., and Santos, M. S. (1976) *Experientia (Basel)* **32**, 428–430
- de Meis, L. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 2055–2062
- Scofano, H. M., Vieyra, A., and de Meis, L. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 10227–10231
- Stahl, N., and Jencks, W. P. (1984) *Biochemistry* **23**, 5389–5392
- Wakabayashi, S., and Shigekawa, M. (1990) *Biochemistry* **29**, 7309–7318
- Mintz, E., Mata, A. M., Forge, V., Passafiume, M., and Guillain, F. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27160–27164
- Sørensen, T., Vilsen, B., and Andersen, J. P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30244–30253
- Sørensen, T. L.-M., Dupont, Y., Vilsen, B., and Andersen, J. P. (eds) (2000) in *Na/K ATPase and Related ATPases* (Kaya, K. T. S., ed) 1207 Vols., pp. 405–408, Excerpta Medica-Elsevier Science, Amsterdam
- Karlisch, S. J., Beauge, L. A., and Glynn, I. M. (1979) *Nature* **282**, 333–335
- Vyskocil, F., Teisinger, J., and Dlouha, H. (1980) *Nature* **286**, 516–517
- Vijaya, S., and Ramasarma, T. (1985) *J. Inorg. Biochem.* **20**, 247–254
- Molnar, E., Kiss, Z., Dux, L., and Guba, F. (1988) *Acta Biochim. Biophys. Hung.* **23**, 63–74
- Andersen, J. P., and Møller, J. V. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **815**, 9–15
- Ortiz, A., Garcia-Carmona, F., Garcia-Canovas, F., and Gomez-Fernandez, J. C. (1984) *Biochem. J.* **221**, 213–222
- Lacapère, J.-J., Bennett, N., Dupont, Y., and Guillain, F. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 348–353
- Andersen, J. P., le Maire, M., Kragh-Hansen, U., Champeil, P., and Møller, J. V. (1983) *Eur. J. Biochem.* **134**, 205–214
- de Foresta, B., le Maire, M., Orlowski, S., Champeil, P., Lund, S., Møller, J. V., Michelangeli, F., and Lee, A. G. (1989) *Biochemistry* **28**, 2558–2567
- de Foresta, B., Henao, F., and Champeil, P. (1994) *Eur. J. Biochem.* **223**, 359–369
- de Foresta, B., Henao, F., and Champeil, P. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 1023–1034
- Inesi, G., Zhang, Z., and Lewis, D. (2002) *Biophys. J.* **83**, 2327–2332
- Cantilina, T., Sagara, Y., Inesi, G., and Jones, L. R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 17018–17025
- Inesi, G., Kurzmack, M., Coan, C., and Lewis, D. E. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 3025–3031
- Lacapère, J.-J., and Guillain, F. (1993) *Eur. J. Biochem.* **211**, 117–126
- Wakabayashi, S., Ogurusu, T., and Shigekawa, M. (1990) *Biochemistry* **29**, 10613–10620
- Forge, V., Mintz, E., and Guillain, F. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10961–10968
- Duchesne, L., Hubert, J. F., Verbavatz, J. M., Thomas, D., and Pietrantonio, P. V. (2003) *Eur. J. Biochem.* **270**, 422–429
- Drueckes, P., Schinzel, R., and Palm, D. (1995) *Anal. Biochem.* **230**, 173–177
- Saheki, S., Takeda, A., and Shimazu, T. (1985) *Anal. Biochem.* **148**, 277–281

Involvement of the L6-7 loop in SERCA1a Ca^{2+} -ATPase activation by Ca^{2+} (or Sr^{2+}) and ATP.

Guillaume Lenoir, Martin Picard, Jesper V. Møller, Marc le Maire, Philippe Champeil and Pierre Falson.

Supplemental Material

Figure A. Freeze fracture electron microscopy of purified WT Ca^{2+} -ATPase reconstituted in an EYPC-EYPA mixture.

The reconstituted WT ATPase sample was processed as described in (82).

Figure B. Ca^{2+} -dependent ATPase activity of purified ADA ATPase, reconstituted with an EYPC-EYPA mixture or with EYPC alone.

To investigate whether the recovery in reconstituted ADA of a fairly high affinity for Ca^{2+} was dependent on trapping caused by the negatively charged EYPA used for reconstitution, we performed an experiment similar to the one described in Fig 2B, but with an ADA ATPase reconstituted either with EYPC alone (closed symbols) or with the EYPC:EYPA mixture (open symbols). It turned out that the presence or absence of EYPA made no difference. Experimental conditions were as in Figure 2B.

Figure C. Effect of C_{12}E_8 and β -dodecyl maltoside on WT and ADA Ca^{2+} -ATPase activities.

The striking effect of detergent illustrated in Fig 2B led us to further explore the effect of C_{12}E_8 and DDM on ADA activity at various stages of solubilization, by

measuring the hydrolytic activity of purified and reconstituted ADA (squares) or WT (circles) ATPase as a function of the C₁₂E₈ or DDM concentration, in the presence of 0.1 mM Ca²⁺, 1 mM ATP, and increasing concentrations of either C₁₂E₈ (panel A) or DDM (panel B). As can be seen in Panel A, an initial reduction of ATPase activity was observed for both WT and ADA ATPases in the presence of low, non-solubilizing concentrations of C₁₂E₈, as it is also the case for SR ATPase (72). Solubilizing concentrations of C₁₂E₈ (e.g. 0.3 - 1 mg/ml) allowed the WT enzyme to recover full activity, again as for SR ATPase (73). For ADA, however, activity recovery at intermediate concentrations of C₁₂E₈ was followed by steep inactivation at higher detergent concentrations. Similar experiments were performed with DDM, as shown in Panel B; in those experiments, high concentrations of DDM also reduced Ca²⁺-ATPase activity of the WT enzyme, as previously found for SR ATPase (73). An unexpected common effect of both C₁₂E₈ and DDM on the ATPase activity of the ADA mutant was that the above-mentioned inhibitory effect of sub-solubilizing concentrations of detergent, previously attributed to local delipidation of the protein (73,74), occurred at a significantly lower detergent concentration (0.05 mg/ml) than for WT (0.1 mg/ml), in the range of the concentrations close the critical micellar concentration (cmc) of each detergent (indicated by an arrow in the Figure). This might suggest less firm interaction of lipids with the ADA mutant.

Figure D. Ca²⁺- or vanadate-dependent conformational changes in WT and ADA ATPases, observed after FITC-labelling.

ATPase labelling with fluorescein isothiocyanate (FITC) was performed by incubating reconstituted WT or ADA ATPase (or SR ATPase, for control), at about 10 µg/ml SERCA protein, with 2 µM of FITC, for 10 minutes at 20 °C and pH 8.0. Unbound FITC was eliminated using a PD-10 desalting column, pre-equilibrated with 150 mM Mops-Tris, pH 7.0 and 100 µM CaCl₂. FITC-treated samples were then diluted 4-fold in 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ and 150 mM Mops-Tris, pH 7.0, and FITC fluorescence measurements were carried out with excitation and emission wavelengths set at 490 and 530 nm, respectively (with 5 nm bandwidths). *A, FITC fluorescence changes upon calcium binding to WT and ADA mutated ATPases (or its dissociation).* After labelling

and elimination of unbound FITC, WT and ADA ATPases were diluted 5 times into 150 mM Mops-Tris, 100 mM KCl and 5 mM Mg^{2+} (pH 7.0 at 20 °C). Total Ca^{2+} was then 25 μM , taking into account 5 μM contaminating Ca^{2+} and 20 μM Ca^{2+} added with the enzyme. A concentration of 500 μM EGTA was added first to reduce the free Ca^{2+} concentration to 0.02 μM , which was then increased to 0.9 and 125 μM by two successive additions of 300 μM $CaCl_2$ and finally to 1.125 mM by adding 1 mM $CaCl_2$, using an apparent $K_{d_{Ca-EGTA}}$ of 0.5 μM in the presence of 5 mM $MgCl_2$. Additions were identical for WT and ADA ATPases as symbolized by the dotted lines. *B, FITC fluorescence changes upon vanadate and Ca^{2+} binding.* Sequential additions were performed as follows: 300 μM EGTA, 100 μM orthovanadate, 375 μM total Ca^{2+} (100 μM free Ca^{2+}) and, in the case of the ADA mutant only, a final addition of 1 mM Ca^{2+} . The curves have been slightly shifted with respect to each other, for clarity.

Additional comments on Figure D:

Panel A of Figure D shows that FITC bound to WT ATPase responded to Ca^{2+} concentration changes in the expected manner, and that FITC bound to ADA ATPase again revealed a poorer affinity of ADA for Ca^{2+} , compared with WT. The changes in fluorescence of bound FITC, here examined in the presence of Mg^{2+} as in (52), were not re-plotted here as a function of free Ca^{2+} , but inspection by mere eye suggests K_d values of about 1 and 10 μM for WT and ADA, respectively, values which are reasonably consistent with those obtained from the tryptophan fluorescence measurements (Figure 3 in the main text) done in the absence of Mg^{2+} . The maximal amplitude of these relative changes is smaller than the corresponding amplitude found for the control SR ATPase (2% vs about 4%), but as discussed in relation to the Trp fluorescence data in Figure 3, this can be easily understood on the basis of the presence of inactivated ATPase or protein contaminants containing FITC-reactive lysine residues.

Panel B shows that WT ATPase also responded to orthovanadate addition in the absence of Ca^{2+} in the expected manner: vanadate enhanced the fluorescence of bound FITC, while subsequent addition of a moderate calcium concentration (final free concentration of 100 μM) reduced the fluorescence of FITC back to initial level. After FITC modification, ADA ATPase displayed the same behaviour as WT upon addition of

EGTA and vanadate, indicating that both proteins undergo the same vanadate-dependent conformational changes in the cytosolic region. However, contrarily to WT, subsequent addition of 100 μM free calcium was not sufficient to reverse the vanadate-induced conformational state, whereas addition of 1 mM Ca^{2+} was sufficient. Since WT and ADA ATPases bind vanadate with the same affinity at equilibrium, as shown below in Fig. H, panel B, this is again consistent with a poorer affinity for Ca^{2+} of ADA ATPase, compared to WT.

Figure E. Tryptophan fluorescence changes upon addition of inorganic phosphate to reconstituted WT and ADA ATPases, and competition with Ca^{2+} of WT and ADA phosphorylation from $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$.

A, changes in tryptophan fluorescence upon addition of inorganic phosphate were monitored using purified and reconstituted WT and ADA Ca^{2+} -ATPases, diluted 20 times into 150 mM Mops-Tris, pH 7.0 (20 °C), 5 mM MgCl_2 and 20 % Me_2SO ; total Ca^{2+} was 55 μM , due to contaminating Ca^{2+} and Ca^{2+} added together with the enzyme. EGTA at a concentration of 0.5 mM was first added, in order to generate a Ca^{2+} -deprived ATPase able to react with Pi, and then various amounts of Pi were sequentially added, to reach total Pi concentrations of 50 μM and 200 μM . Ca^{2+} at a total concentration of 1 mM (550 μM free Ca^{2+}) was finally added, to restore the E1 Ca_2 fluorescence level. *B and C*, for phosphorylation experiments from $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$, the medium now contained 20 mM MgCl_2 in addition to 20 % Me_2SO and 100 mM Mops-Tris at pH 7.0 (20 °C). The reaction was carried out at the indicated $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ and stopped after 30 seconds by acid quenching, as described below. Samples were run on SDS-PAGE gels using the Sarkadi or Weber-Osborn's method (gels corresponding to the latter method are shown), and phosphorylation was measured and plotted (*Panel C*) for WT (circles) and ADA (squares). Data are average values corresponding to 3 independent experiments.

Additional comment on Figure E:

As shown in Panel A, sequential addition of Pi to the purified and reconstituted WT enzyme in its Ca^{2+} -free state increased the tryptophan fluorescence with an amplitude about half of that obtained in the presence of saturating Ca^{2+} , while subsequent

addition of a high calcium concentration restored the initial level, as expected. ADA underwent similar fluorescence changes upon binding of inorganic phosphate. Addition of a high Ca^{2+} concentration again further raised the ADA fluorescence, up to the initial level, again as expected. Addition of more moderate concentrations of Ca^{2+} were however less efficient for ADA than for WT (data not shown), confirming the poorer affinity of ADA for Ca^{2+} . The same conclusions can be derived from Panels B and C, where phosphorylation from [^{32}P]Pi was measured.

Experimental Procedures for the handling of phosphorylated proteins in this work:

In all cases, the reaction was stopped by acid quenching with trichloroacetic acid (TCA) and H_3PO_4 , added at final concentrations of 1 M and 67 mM, respectively. Samples were then left on ice for 20 minutes and centrifuged at 28,000xg for 25 minutes at 4 °C. Supernatants were discarded and pellets washed with 800 μl of 75 mM TCA and 5 mM H_3PO_4 . After centrifugation, the pellets were resuspended by vortexing for one minute in 50 μl of buffer containing 150 mM Tris-Cl pH 6.8, 2 % SDS, 10 mM EDTA, 16 % glycerol, 0.8 M β -mercaptoethanol and 0.04 % bromophenol blue. Aliquots of 20 μl were then loaded onto Sarkadi-type gels (39) for electrophoretic separation as detailed below. Alternatively, pellets were resuspended with 10 % lithium dodecyl sulphate, 5 mM NaH_2PO_4 , 0.005 % SDS, 0.3 M β -mercaptoethanol, 20 % glycerol and 0.04 % bromophenol blue, and 20- μl aliquots were subjected to SDS-PAGE as described by Weber & Osborn (40).

Separation of phosphorylated proteins by SDS-PAGE was generally done by using Sarkadi-type gels as described previously (39,41,42), with the following modifications. The stacking gel contained 4 % polyacrylamide (29:1 acrylamide:bisacrylamide), 65 mM Tris- H_3PO_4 pH 5.5, 0.1 % SDS, 2 % ammonium persulfate and 0.1 % N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED). The separating gel was a continuous 7 % polyacrylamide gel containing 65 mM Tris- H_3PO_4 pH 6.5, 0.1 % SDS, 0.4 % ammonium persulfate and 0.05 % TEMED. Gels were run at 80-100 V and 10 mA/gel for about 3 h at 4 °C. The running buffer contained 0.1 % SDS and 170 mM Mops-Tris at pH 6.0, and was kept under stirring during electrophoresis. After

electrophoresis, gels were stained and fixed for 10 minutes in 40 % methanol, 10 % acetic acid and 0.1 % Coomassie blue R250. Excess of dye was removed in 10 % acetic acid, 10 % methanol and 1 % glycerol. The gels were dried overnight between two sheets of cellophane paper. Radioactivity was revealed with a STORM 860 Phosphorimager and quantified by comparison with known amounts of [γ - 32 P]ATP or [32 P]Pi. On some occasions, samples were also run on acidic gels according to the method of Weber & Osborn (40).

Figure F. Utilization of Ca^{2+} -ATP as a substrate, instead of MgATP, by ADA or WT at high Ca^{2+} concentrations, as revealed by the kinetics of phosphoenzyme decay.

Phosphorylation of SR (triangles), WT (circles) or ADA (squares) ATPase was first carried out, on ice, with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ATPase incubated in buffer A supplemented with 2 μM [γ - 32 P]ATP and either 10 mM (“high”, closed symbols) or 100 μM (“low”, open symbols) free calcium. After 15 seconds of reaction, 100 μM non-radioactive ATP was added to the solution and the reaction was stopped by acid-quenching after various periods of time. Radioactivity was quantified with a PhosphorImager as for Panel A in Figure 4 of main text, the amount of phosphoenzyme present at the end of the 15-second phosphorylation period being taken as 100 %.

Figure G. Vanadate-dependent oxidation of NADH in the absence of any membranes.

NADH oxidation was followed by continuously monitoring its absorbance at 340 nm, in a medium containing 50 mM Mops-Tris at pH 7.0 (20 °C), 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 100 μM CaCl_2 and 0.3 mM NADH. For the left trace, it also contained 1 mM phosphoenolpyruvate, 0.1 mg/ml pyruvate kinase, 0.1 mg/ml lactate dehydrogenase and 1 mM MgATP. ADP (20 μM) was first added, followed by SR vesicles (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and A23187 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Then, increasing amounts of orthovanadate were added, leading to total concentrations of 30 μM , 330 μM and 1030 μM . Vanadate increased the rate of NADH oxidation, instead of demonstrating the expected inhibition of ATPase activity. Right trace, same experiment in buffer alone (without PEP, PK, LDH, ATP or SR

membranes), to which vanadate alone was added at the same final concentrations, inducing marked increases in the rate of non enzymatic NADH oxidation (66).

Figure H. Vanadate-sensitivity of purified and reconstituted WT or ADA ATPases.

A, the rates of ATP hydrolysis by purified and reconstituted WT (circles) or ADA (squares) Ca^{2+} -ATPase (or SR vesicles, triangles and dotted lines) were determined by measuring (with a phospho-molybdate colorimetric assay; see below) the amount of Pi liberated within 25-50 minutes *B*, the true affinity with which ATPase interacts with orthovanadate was measured as the residual activity remaining after extended incubation of the membranes in the absence of Ca^{2+} and the presence of various concentrations of orthovanadate together with glycerol, followed by dilution into a vanadate-free coupled enzyme assay medium (see below). Note that in both Panel A and Panel B of this Figure, vanadate inhibition was found to be slightly more effective for SR than for WT ATPase, with respect to both the extent of inhibition and the EC_{50} . The first fact at least is easily understandable, as essentially all ATPase activity in SR vesicles is due to the SERCA, whereas this is not the case in our partially purified expressed ATPase.

Specific Experimental Procedures for measurement of vanadate inhibition of ATPase:

For the studies illustrated in panel A of inhibition by vanadate of steady-state ATPase turnover, the ATPase activity was estimated from the amount of Pi liberated by a colorimetric assay. In that case, 2 $\mu\text{g/ml}$ of sarcoplasmic reticulum membranes or 4 $\mu\text{g/ml}$ purified and reconstituted WT or ADA ATPase were added to 140 μl of assay medium, containing 50 mM Mops-Tris at pH 7.0 (20 °C), 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM MgATP, 2 $\mu\text{g/ml}$ A23187, 1 mM phosphoenolpyruvate, 0.1 mg/ml pyruvate kinase and 100 μM total Ca^{2+} . Various concentrations of orthovanadate were also added, up to 1 mM. The hydrolysis of ATP was triggered by the addition of membranes, and quenched by addition of 70 μl of 10 % SDS, supplemented with 0.05 % antifoam A (Sigma). Inorganic phosphate was revealed with molybdate by adding 490 μl of a solution prepared by mixing one part of 4 % ammonium molybdate in 15 mM Zinc acetate at pH

5 with four parts of 10 % freshly prepared ascorbic acid, titrated to pH 5 with NaOH. The blue color developed over 90 minutes at room temperature (83,84) was read as duplicates in 96-well microtiter plates, at 690 nm on a Multiskan Bichromatic spectrophotometer. The concentration of phosphate released was calculated from standard curves (0-0.2 mM range) prepared in the absence or presence of vanadate.

For the measurement, illustrated in panel B, of the ATPase “true” affinity for vanadate at equilibrium, different concentrations of vanadate were incubated for 60-80 minutes with 0.16 or 0.2 mg/ml of purified and reconstituted WT or ADA ATPases, respectively, or with 0.1 mg/ml SR membranes, in the medium used for storage of the purified and reconstituted ATPases (25 mM Mops-Tris at pH 7.0, 40 % glycerol, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM DTT and 100 mM KCl), supplemented with 4 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA and 2 $\mu\text{g/ml}$ A23187. Residual ATPase activity was then measured within the first 30 seconds following a 20-fold dilution into a standard enzyme-coupled assay buffer (i.e. before vanadate release). This buffer contained 50 mM Mops-Tris at pH 7.0 (20 °C), 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM MgATP, 1 mM phosphoenolpyruvate, 0.1 mg/ml pyruvate kinase, 0.1 mg/ml lactate dehydrogenase and 0.3 mM NADH, to which 300 μM total Ca^{2+} had been added to attain 100 μM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ after addition of the preincubated membranes.

Figure I. Slow reactivation, upon dilution into a vanadate-free assay medium, of ATPase activity previously inhibited by orthovanadate.

SR vesicles were incubated here at 1 mg/ml (plus 20 $\mu\text{g/ml}$ A23187) and at a very low $\text{Ca}^{2+}_{\text{free}}$ concentration (0.1 mM Ca^{2+} + 0.6 mM EGTA) in the absence (left trace) or presence (right trace) of 150 μM orthovanadate, for 10 minutes, and then diluted 100-fold into a standard Ca^{2+} -containing medium for coupled-enzyme assay of the residual ATPase activity (the assay medium contained 50mM Mops-Tris, pH 7.0 (20 °C), 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM MgATP, 1 mM phosphoenolpyruvate, 0.1 mg/ml pyruvate kinase, 0.1 mg/ml lactate dehydrogenase, 0.3 mM NADH and 100 μM free Ca^{2+}). The addition of 1.5 μM vanadate (arrow) to the left trace did not significantly affect activity.

Supplemental Material

Fig A. Freeze fracture electron microscopy.

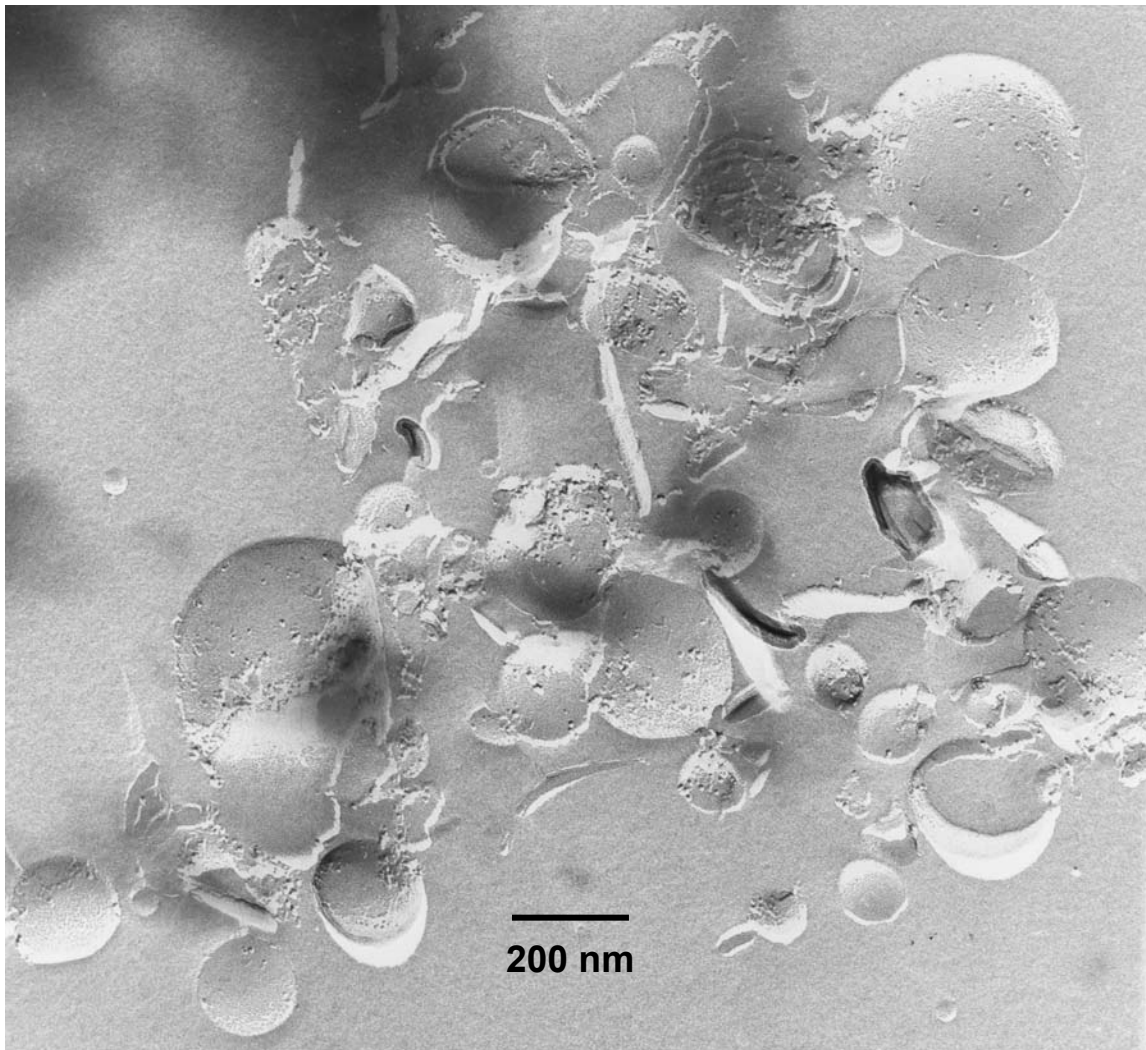


Fig B. Ca^{2+} -dependent ATPase activity of purified ADA Ca^{2+} -ATPase, reconstituted with EYPC-EYPA mix or EYPC alone.

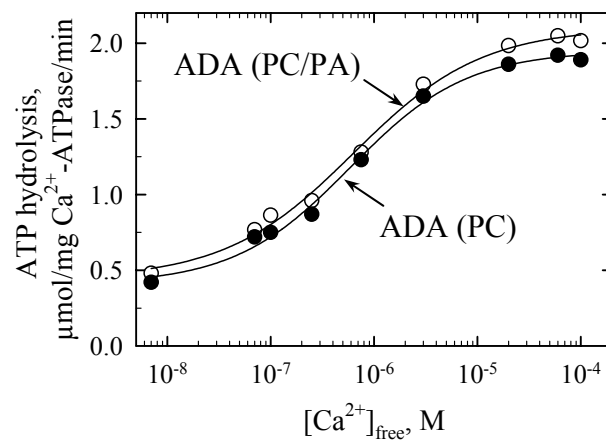


Fig C. Effect of $C_{12}E_8$ and β -dodecyl maltoside on WT and ADA Ca^{2+} -ATPase activities.

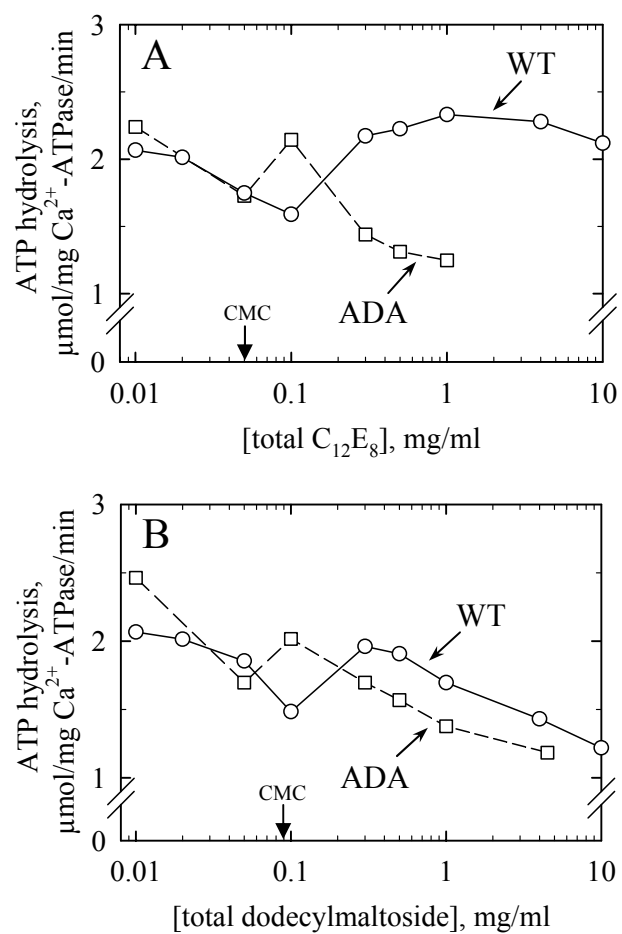


Fig D. Ca^{2+} and VO_4 -dependent conformational changes in FITC-labelled WT and ADA ATPases.

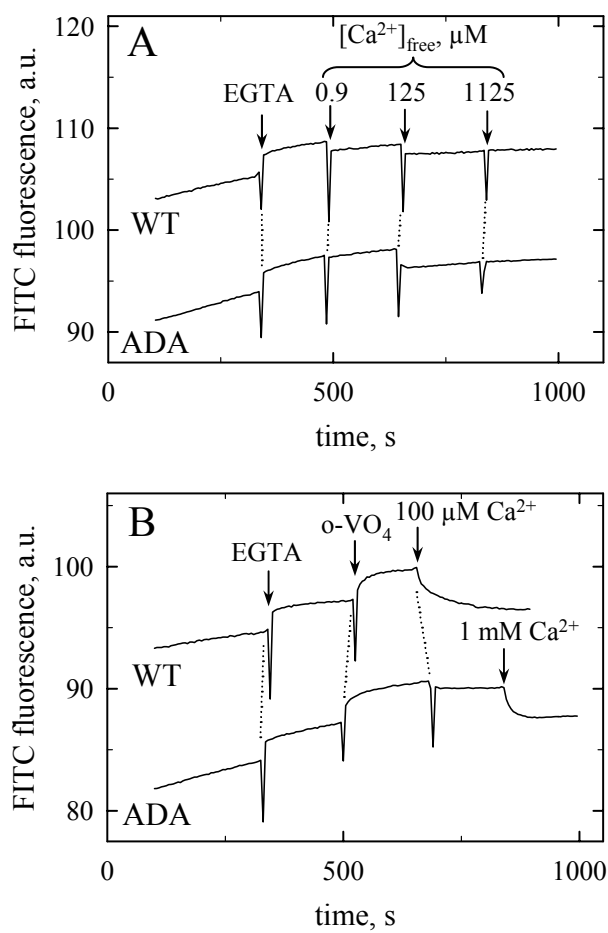


Fig E. Trp fluorescence changes of WT and ADA ATPases upon addition of inorganic phosphate, and competition with Ca^{2+} of phosphorylation from $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$.

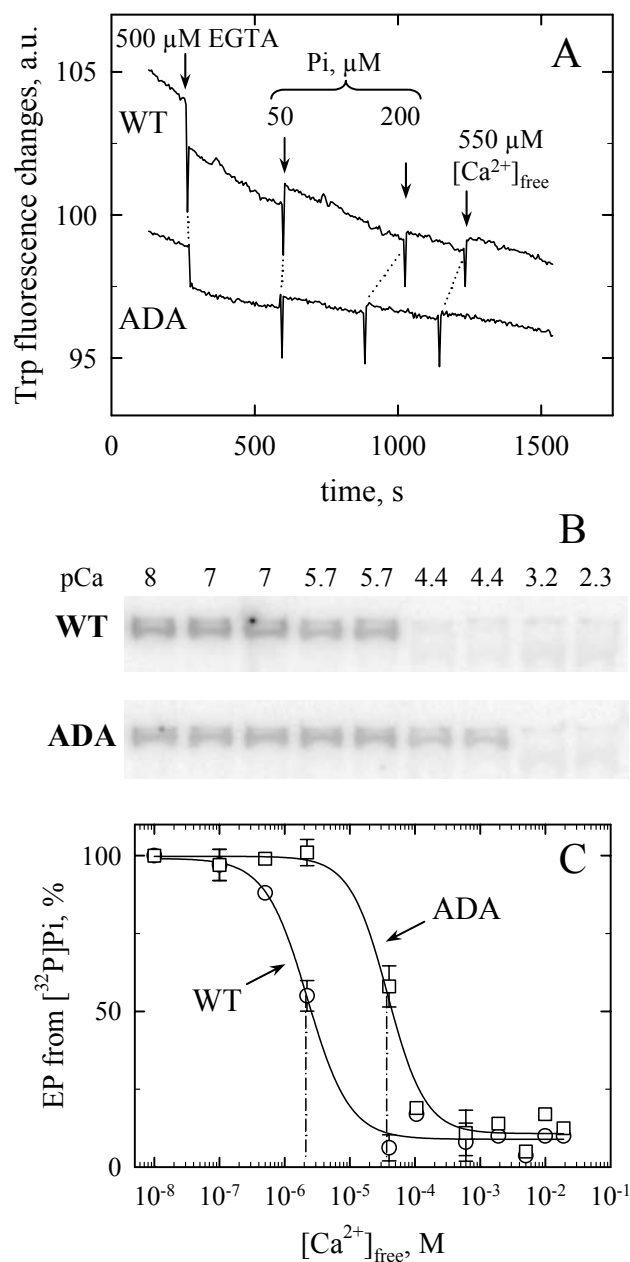


Fig F. Utilization of Ca^{2+} -ATP as a substrate at high Ca^{2+} concentrations.

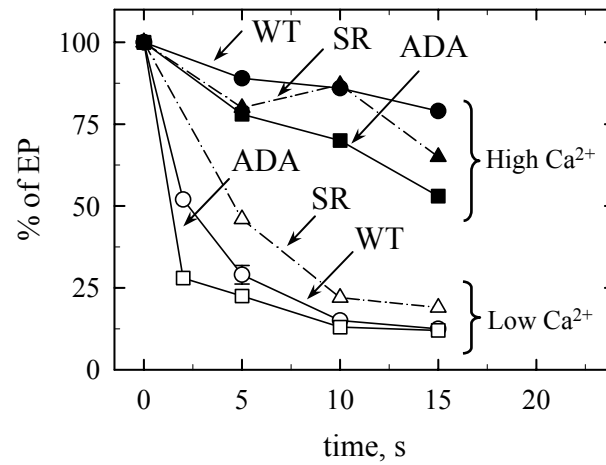


Fig G. Vanadate-dependent oxidation of NADH in the presence or absence of membranes.

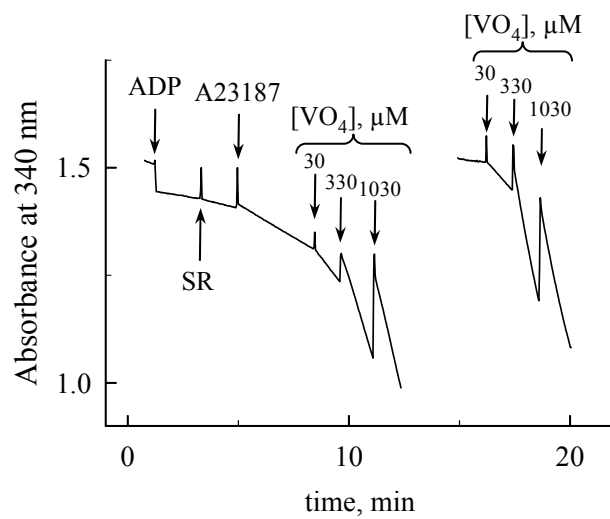


Fig H. Vanadate-sensitivity of ATP hydrolysis by
WT or ADA ATPase.

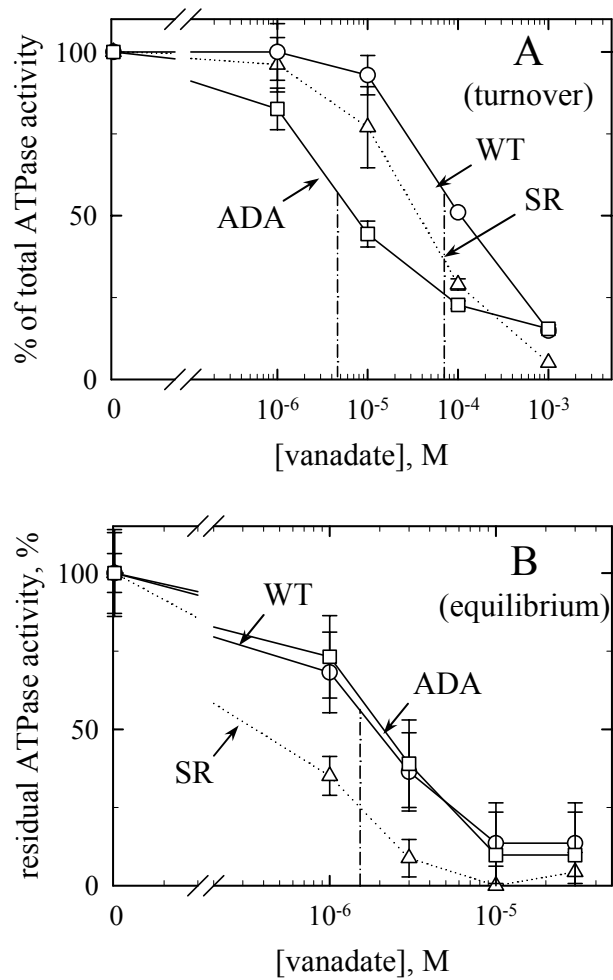
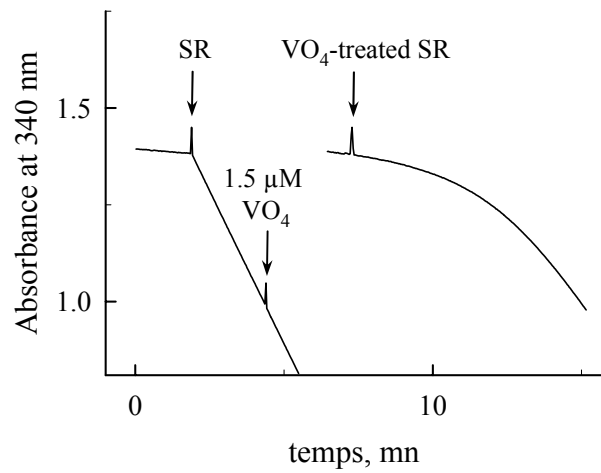


Fig I. Slow reactivation, upon dilution into a vanadate-free assay medium, of ATPase activity previously inhibited by orthovanadate.



Chapitre V: Influence des conditions de cristallisation sur la conformation de l'ATPase-Ca²⁺

1. Effet d'une concentration élevée de Ca²⁺ sur la conformation adoptée par l'enzyme en présence d'AMPPCP (Manuscrit # 3)

1.1. Occlusion des sites Ca²⁺ en présence d'AMPPCP et en
absence de Ca²⁺ ? Non !

1.2. Un effet du milieu de cristallisation ?

1.3. Effet d'une forte concentration en Ca²⁺ sur la conformation
de l'ATPase

1.4. Evaluation directe de la capacité des sites de fixation du Ca²⁺
à s'ouvrir, lorsque le milieu contient à la fois AMPPCP et
fort Ca²⁺ : mesures d'échange ⁴⁵Ca²⁺/⁴⁰Ca²⁺ par filtration rapide

1.5. Conclusion

2. Effet de la présence d'inhibiteurs de l'ATPase sur l'accessibilité luminale des sites Ca²⁺ dans les formes « E2P-like » (Manuscrit # 4)

2.1. Fluorescence intrinsèque des différents complexes fluorés

2.2. Mesures de la fixation de ⁴⁵Ca²⁺ du côté luminal,
après réaction de l'ATPase avec les fluorures

2.3. Conclusions

3. Manuscrit # 3:

The average conformation at micromolar [Ca²⁺] of Ca²⁺-ATPase with bound nucleotide *differs* from that adopted with the transition state analog ADP.AIFx or with AMPPCP under crystallization conditions at millimolar [Ca²⁺].

Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. (2005)
J. Biol. Chem. 280, 18745-18754.

4. Manuscrit # 4:

Effects of inhibitors on luminal opening of Ca²⁺ binding sites in an E2P-like complex of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase with Be²⁺-fluoride

Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. (2005)
Accepté dans J. Biol. Chem.

Chapitre V: Influence des conditions de cristallisation **sur la conformation de l'ATPase-Ca²⁺**

Je présenterai dans une première partie de ce chapitre les résultats que j'ai acquis confirmant que la fixation d'AMPPCP sur l'ATPase n'entraîne pas l'occlusion des ions Ca²⁺ dans les conditions classiques, et suggérant que la forme particulière cristallisée en présence d'AMPPCP n'est pas forcément représentative du complexe enzyme-substrat dans les conditions ordinaires, et nous essaierons de comprendre la raison de ce paradoxe. Je présenterai dans une deuxième partie de ce chapitre le travail que nous avons réalisé ensuite, dans le même ordre d'idée, pour étudier l'effet de la présence d'un inhibiteur de l'ATPase lors de la cristallisation en absence de Ca²⁺ de complexes fluorés de l'ATPase.

1. Effet d'une concentration élevée de Ca²⁺ sur la conformation **adoptée par l'enzyme en présence d'AMPPCP (Manuscrit # 3)**

Notre compréhension des mécanismes de transport de l'ATPase-Ca²⁺ a bien sûr été grandement augmentée par la publication de structures à haute résolution, obtenues par diffraction des rayons X pour différents intermédiaires réactionnels. Par exemple, à l'occasion d'un congrès de la FASEB auquel nous avons pu assister à l'été 2003, C. Toyoshima nous a montré deux structures qu'il était sur le point de publier, toutes deux obtenues en présence de Ca²⁺. L'une de ces structures avait été obtenue en présence d'ADP et de fluoroaluminate (forme E1.ADP.AIF₄, cf. Introduction) ; incubée dans de telles conditions, l'enzyme est supposée mimer l'état de transition adopté par l'ATPase au moment de sa phosphorylation par l'ATP, car le fluoroaluminate est réputé avoir une configuration plane proche de celle qu'adopte le phosphate gamma de l'ATP au cours de son transfert vers l'aspartate du site actif. La structure cristalline de cette forme très stable a bien révélé l'arrangement attendu au site actif. En outre, et de façon remarquable, le nouvel arrangement des segments transmembranaires et de leurs connexions avec le domaine cytoplasmique a permis de comprendre que les ions calcium fixés sur leurs sites transmembranaires y soient occlus, propriété qui avait déjà été décrite expérimentalement (Troullier et al. 1992).

Cependant, la deuxième structure que nous a montrée Chikashi Toyoshima lors de ce congrès, obtenue en présence d'AMPPCP (un analogue non hydrolysable de l'ATP, cf par exemple (Cable et al. 1985)), était paradoxale. Cette structure cristalline était quasiment identique à celle décrite dans le cristal ADP/fluoroaluminate, y compris du point de vue de l'occlusion des Ca²⁺. Or des données bibliographiques de 1991 suggéraient que la simple fixation d'AMPPCP sur l'enzyme ne jouait qu'un rôle marginal sur la vitesse de dissociation des Ca²⁺ (Orlowski and Champeil 1991).

Au retour de ce congrès, nous avons donc commencé une série d'expériences destinées à vérifier ou infirmer les résultats acquis en 1991, et j'ai pu me rendre dans le laboratoire de C. Toyoshima à l'automne 2003 pour voir d'un peu plus près la structure commune de ces deux formes, quelques mois avant la publication de la structure « E1.AMPPCP » par son laboratoire (Toyoshima and Mizutani 2004), ainsi d'ailleurs que par le laboratoire de Poul Nissen à Aarhus, en fait quelques semaines auparavant (Sørensen et al. 2004). Ce voyage fut aussi l'occasion pour moi de présenter les résultats expérimentaux que nous avons déjà acquis, qui confirmaient la reproductibilité de l'observation de 1991. Ce premier travail en relation directe avec une structure cristallographique particulière nous a alors renforcé dans l'idée, déjà présente au début de ma thèse, que le meilleur rôle que nous pouvions jouer,

désormais, en tant que fonctionnalistes, à ce moment particulier de l'histoire de l'ATPase, était peut-être de poser la question de la pertinence fonctionnelle des fascinantes structures désormais disponibles, avant qu'elles ne soient durablement transformées en vérité intouchable.

1.1. Occlusion des sites Ca^{2+} en présence d'AMPPCP et en absence de Ca^{2+} ? Non !

Nous avons utilisé deux types de méthodologies dans le but de déterminer si les sites Ca^{2+} d'une ATPase incubée en présence d'AMPPCP (ou en présence d'ADP et de fluoroaluminate) étaient ou non occlus, c'est-à-dire si leur ouverture vers le milieu aqueux, cytosolique (et donc la dissociation de calcium) était interdite ou non.

Une première méthode repose sur la technique de filtration rapide (cf. Matériel et Méthodes). Dans ces expériences, on préincube en présence de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (50 μM) des vésicules suspendues dans un milieu contenant Mops-Tris 50 mM, KCl 100 mM et Mg^{2+} 5mM (pH 7, 20°C), en présence également de 250 μM ou 2,5 mM d'AMPPCP (triangles noirs ou blancs, respectivement) ou de 100 μM d'ADP, 1 mM de KF et 50 μM d' AlCl_3 (carrés blancs), ou encore en absence de ces différents substrats (ronds noirs). Les vésicules sont ensuite adsorbées sur un filtre de nitrocellulose (Millipore HA) que l'on perfuse pendant des temps courts avec une solution contenant un chélateur du Ca^{2+} (1 mM d'EGTA). La radioactivité résiduelle sur le filtre est alors comptée et la fraction de cette radioactivité due au $^{45}\text{Ca}^{2+}$ qui « mouille » simplement le filtre (voir Matériel et Méthodes) en est soustraite, pour donner le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fixé sur les membranes de SR (*i.e.* sur l'ATPase, pour l'essentiel). Dans des conditions où le Ca^{2+} peut librement se dissocier de ses sites, la radioactivité sur le filtre diminuera ; en revanche, s'il y a effectivement occlusion, la radioactivité comptée sur le filtre (le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fixé sur l'ATPase) restera stable au cours du temps.

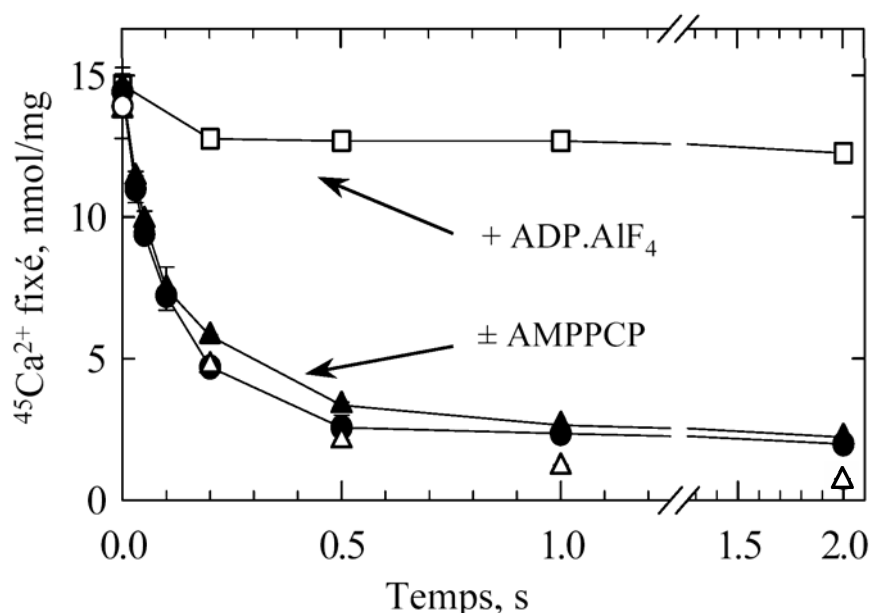


Figure 1. Effet de l'AMPPCP et d'un mélange ADP/KF/ AlCl_3 sur la vitesse de dissociation des ions $^{45}\text{Ca}^{2+}$ de leurs sites. Technique de filtration rapide, vésicules perméabilisées avec un ionophore à Ca^{2+} .

La Figure 1 montre que la radioactivité restant liée aux vésicules préalablement incubées en présence d'ADP et fluoroaluminate reste pratiquement constante au cours du temps, ce qui confirme l'occlusion initialement montrée par (Troullier et al. 1992). En

revanche, dans les autres conditions testées, cette radioactivité décroît, avec une cinétique de décroissance quasiment identique dans les conditions contrôles et en présence d'AMPPCP, même à concentrations importantes : la présence d'AMPPCP n'a là aucun effet sur l'ouverture des sites Ca^{2+} .

Pour dupliquer ce résultat, nous avons également utilisé une deuxième méthode, une technique de spectroscopie de fluorescence en « stopped-flow ». Le principe de cette technique est lui aussi décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes. Ici, nous déterminons la vitesse de dissociation du Ca^{2+} en suivant les changements de fluorescence d'un chélateur fluorescent du Ca^{2+} , le quin2 (Figure 2).

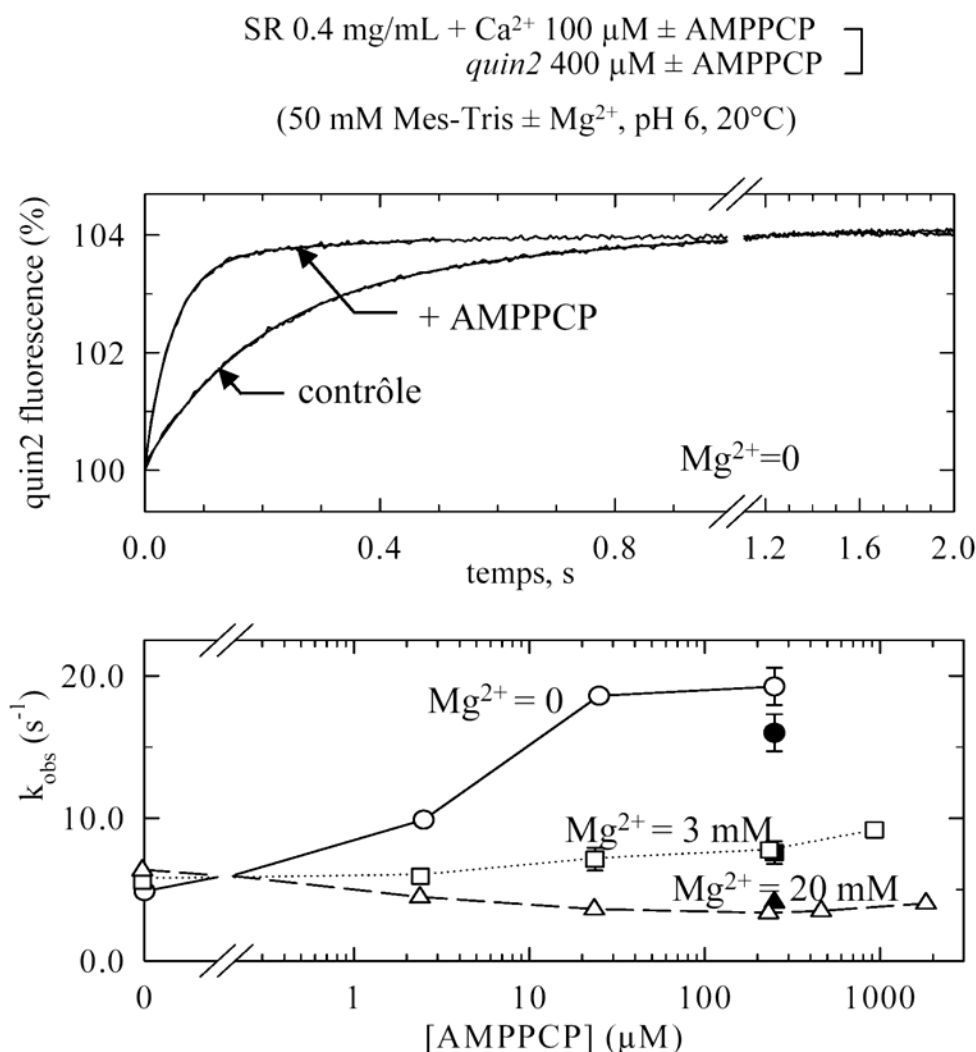


Figure 2. Effet de l'AMPPCP sur la vitesse de dissociation du Ca^{2+} en présence d'AMPPCP à diverses concentrations de Mg^{2+} . Technique de stopped-flow.

On préincube 0,4 mg/ml de SR en présence de 100 μM de Ca^{2+} , une concentration suffisamment élevée pour que l'on soit sûr que tous les sites Ca^{2+} soient saturés (à raison de 10-12 nanomoles de Ca^{2+} lié par mg de protéine (Figure 1), cela correspond à 4-5 μM de Ca^{2+} lié). Lorsqu'on mélange (vol/vol) ce SR avec une solution de quin2 initialement à la concentration de 400 μM , on observe que la fluorescence du quin2 augmente de quelques %, avec une certaine cinétique: comme la chélation par 200 μM de quin2 d'un ion Ca^{2+} en solution est quasiment instantanée à cette échelle de temps (elle se produit en moins de quelques millisecondes), cette cinétique traduit en fait la cinétique de dissociation dans le milieu des ions Ca^{2+} précédemment fixés sur l'enzyme. Le changement de fluorescence

observé dans ces conditions de pH est parfaitement monophasique. Ces résultats sont cohérents avec les résultats des mesures de dissociation de calcium décrites dans la littérature, qu'ils aient été obtenus avec la même technique spectroscopique (Champeil et al. 1997) ou par filtration rapide près marquage isotopique au $^{45}\text{Ca}^{2+}$, comme vu précédemment et décrit dans la littérature (Inesi 1987; Orłowski and Champeil 1991).

Lorsqu'on réalise cette même expérience en présence d'AMPPCP, la dissociation des Ca^{2+} n'est certainement pas bloquée. Au contraire, dans les conditions présentées Figure 2A, elle est même accélérée. L'amplitude du signal est du même ordre de grandeur en présence ou en absence de nucléotide, ce qui correspond à ce que l'on attend. Nous avons réalisé ce type de mesure dans des conditions variées, en particulier en présence de concentrations différentes de Mg^{2+} . A très forte concentration de Mg^{2+} , la présence d'AMPPCP dans le milieu ralentit légèrement la dissociation de Ca^{2+} (Figure 2B), mais on ne peut évidemment pas pour autant conclure de façon générale à une occlusion franche des ions Ca^{2+} en présence d'AMPPCP. Au vu des résultats obtenus en solution, la structure cristalline obtenue en présence d'AMPPCP est donc bel et bien paradoxale.

1.2. Un effet du milieu de cristallisation ?

Les cristaux tridimensionnels de protéines sont souvent obtenus dans des conditions extrêmes, pour assurer la stabilité de la protéine pendant le processus de cristallogénèse.

Pour l'ATPase, par exemple, il est établi depuis longtemps que SERCA est particulièrement instable en présence de détergent et en absence de Ca^{2+} (Lund et al. 1989). De fait, la cristallisation de l'ATPase en absence de Ca^{2+} n'a jusqu'ici été possible qu'après avoir ajouté des inhibiteurs de l'ATPase supposés « geler » la protéine dans une conformation moins facilement dénaturable (nous étudierons l'effet de ces inhibiteurs sur la conformation de l'enzyme un peu plus loin). Si l'on veut cristalliser l'ATPase en présence de Ca^{2+} , on doit donc se placer à des concentrations de Ca^{2+} telles que le plus grand nombre possible d'ATPases aient leurs sites occupés par du Ca^{2+} , car il suffit qu'une infime proportion de cette population soit dépourvue de Ca^{2+} pour que, en quelques minutes, cette sous-population toujours renouvelée s'inactive. Or, c'est pendant les quelques jours ou quelques semaines que dure la cristallogénèse que la suspension d'ATPase doit rester stable et homogène. On s'attend donc traditionnellement à ne réussir à produire des cristaux d'ATPase complexée au Ca^{2+} qu'à des concentrations de Ca^{2+} fortes, très supérieures à la constante de dissociation vraie des sites de fixation du Ca^{2+} (constante qui est micromolaire ou submicromolaire), et d'ailleurs on n'y arrive que dans des conditions de concentrations en Ca^{2+} millimolaires, typiquement 10 mM.

Cependant, les très fortes concentrations de Ca^{2+} ne sont pas sans conséquences sur le fonctionnement de l'ATPase : leur effet inhibiteur sur l'activité ATPasique est largement connu (Møller et al. 1980; voir aussi la Figure 3 du chapitre III). Nous avons donc cherché à évaluer si la présence de ces très fortes concentrations de Ca^{2+} dans les milieux de cristallisation pouvait s'avérer responsable du paradoxe ci-dessus.

1.3. Effet d'une forte concentration en Ca^{2+} sur la conformation de l'ATPase

Pour caractériser les différentes conformations qu'adopte l'ATPase lors de son cycle catalytique, de nombreux types d'études sont possibles, et souvent complémentaires. Trois études conformationnelles ont été mises en œuvre pour déterminer l'effet du Ca^{2+} sur la conformation de l'ATPase ; nous n'en montrerons ici que deux (pour de plus détails, voir l'article publié à l'occasion de ce travail (Picard et al. 2005b), dont nous avons inséré une copie à la fin de ce chapitre).

- Susceptibilité de l'ATPase à la protéolyse par la protéinase K.

Pour caractériser les différentes conformations de l'ATPase, on peut par exemple étudier dans différentes conditions la capacité d'une protéase (protéinase K, protéinase V8, trypsine...) à cliver la chaîne polypeptidique en certains points particuliers (en vérifiant que ces conditions n'affectent pas l'activité de la protéase elle-même). Par exemple, Danko et collaborateurs se sont intéressés de cette façon aux changements conformationnels consécutifs à la fixation d'ATP (de E1 à E1.ATP) et à la phosphorylation qui lui fait suite, ainsi que, justement, aux effets de la fixation de l'AMPPCP (non hydrolysable) ou aux effets de la fixation simultanée de l'ADP et du fluoroaluminate (Danko et al. 2001b). Ces travaux ont permis de mettre en évidence que l'enzyme adopte une structure beaucoup plus résistante à la protéolyse (sans doute parce que plus compacte) après sa phosphorylation par l'ATP plutôt qu'en présence de calcium seul. Et, de même, la résistance à la protéolyse en Ca^{2+} est beaucoup plus complète en présence d'ADP/fluoroaluminate qu'en présence d'AMPPCP, ce que confirment Sørensen et al (2004). Une étude de mutagenèse dirigée a permis de mettre en évidence l'importance, pour la protection induite par l'AMPPCP, des résidus impliqués dans la fixation du nucléotide et des résidus impliqués dans la fixation de calcium (Ma et al. 2003).

Nous avons réalisé des expériences de protéolyse semblables, avec ou sans AMPPCP, dans un premier temps en présence de 100 μM de Ca^{2+} (Figure 3A).

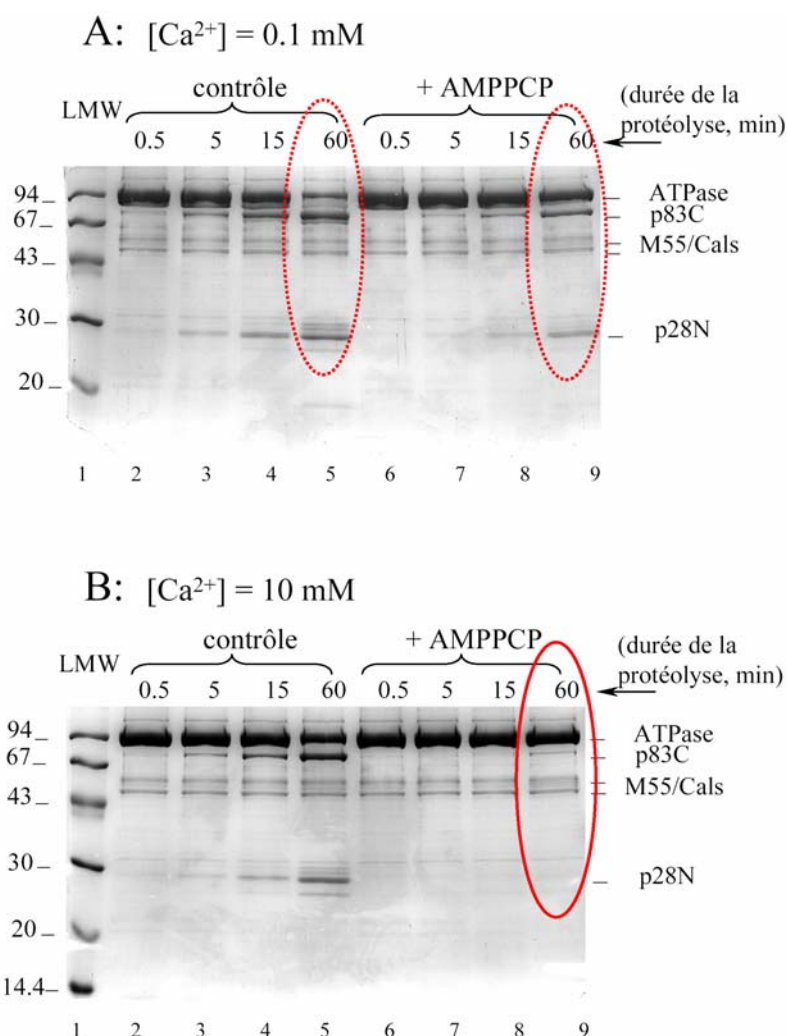


Figure 3. Effet de l'AMPPCP sur le profil électrophorétique des protéines du SR, après coupure à la protéinase K en présence et en absence d'AMPPCP 0.5 mM, à concentration de Ca^{2+} « ordinaire » (100 μM , panneau A) ou au contraire à concentration de Ca^{2+} très forte (10 mM, panneau B).

En présence de Ca^{2+} , le premier site de clivage par la protéinase K se situe au niveau de la boucle reliant le domaine A et le segment transmembranaire M3 (entre les résidus Thr242 et Glu243). Cette coupure donne naissance à un fragment C-terminal de 83 kDa, le fragment « p83C », et à son complémentaire de 28 kDa, le fragment « p28N ». La formation de ces différents fragments peut être mise en évidence sur gel d'acrylamide, tel que celui présenté Figure 3A (puits 2 à 5) (cf aussi la Figure 1 du chapitre IV). Nous retrouvons aussi sur ce gel les résultats décrits par Danko et collaborateurs (2001b) et par Møller et al. (2002) concernant l'effet protecteur du nucléotide vis-à-vis d'une protéolyse en présence de Ca^{2+} : la formation de la bande « p83C » est légèrement ralentie en présence de 0,5 mM d'AMPPCP dans le tampon de protéolyse (puits 6 à 9). Nous avons alors répété cette expérience à beaucoup plus forte concentration de Ca^{2+} . En présence de 10 mM de Ca^{2+} seul, la protéolyse aboutit comme précédemment à la coupure entre Thr242 et Glu243 (et par conséquent à la formation des bandes p83C et p28N), et elle n'est que faiblement ralentie (Figure 3B, puits 2 à 5). Mais la protection conférée par la présence additionnelle de nucléotide (Figure 3B, puits 6 à 9) est maintenant pratiquement totale (les bandes « M55/Cals » ne sont pas des produits de coupure, ce sont des protéines présentes à l'intérieur des vésicules -glycoprotéine M55 et calséquestrine-, et qui donc ne sont pas protéolysées). La présence simultanée d'AMPPCP et de 10 mM de Ca^{2+} entraîne donc une résistance accrue de l'ATPase lorsqu'elle fixe son nucléotide. Une résistance quasi-totale est atteinte lorsque la protéolyse est réalisée en présence d'ADP et AlF_4 (Danko et al., 2001b).

- Propriétés de fluorescence intrinsèque de l'ATPase

Les propriétés de fluorescence intrinsèque de l'ATPase dépendent principalement de l'environnement de ses 13 résidus tryptophane (Trp). Douze d'entre eux sont situés dans la région membranaire, le dernier est situé dans le domaine *N* cytosolique. Les différentes transitions conformationnelles de l'enzyme au cours de son cycle catalytique donnent lieu à des variations de fluorescence: transition $\text{E2} \leftrightarrow \text{Ca}_2\text{E1}$ (Champeil et al. 1976; Dupont 1976), fixation de nucléotides (Lacapère et al. 1990), phosphorylation par le P_i (Lacapère et al. 1981)... Nous avons décidé de comparer les variations de fluorescence accompagnant la fixation de l'AMPPCP et ceux accompagnant la formation de la forme E1.ADP.AlF_4 . Ces derniers n'avaient jamais encore été caractérisés: il avait simplement été montré que la formation en absence de calcium du complexe E2.AlFx (inactif) ne s'accompagnait que d'une lente et faible diminution de fluorescence (Troullier et al. 1992). De nouveau, l'expérience a été réalisée à deux concentrations de calcium différentes.

Pour ces mesures, des membranes de SR sont suspendues (à la concentration de 0,1 mg/ml) dans un tampon Mops-Tris 50 mM, KCl 100 mM et Mg^{2+} 5 mM (pH 7 et 20°C), et les signaux de fluorescence sont examinés en réglant la longueur d'onde d'excitation à 295 nm et la longueur d'onde d'émission à 330 nm. La longueur d'onde d'excitation est choisie dans le pied de la bande d'excitation des tryptophanes pour éviter que les changements de fluorescence recherchés lors de l'addition du nucléotide ne soient biaisés par l'extinction partielle du faisceau excitateur par le nucléotide ajouté (effet de « filtre interne »), car les nucléotides absorbent dans l'UV. Comme cet effet de filtre interne reste néanmoins significatif à forte concentration de nucléotide, nous devons aussi nous restreindre à des conditions pour lesquelles l'enzyme a une bonne affinité pour le nucléotide, de manière à ne pas avoir à ajouter des concentrations trop importantes de nucléotides.

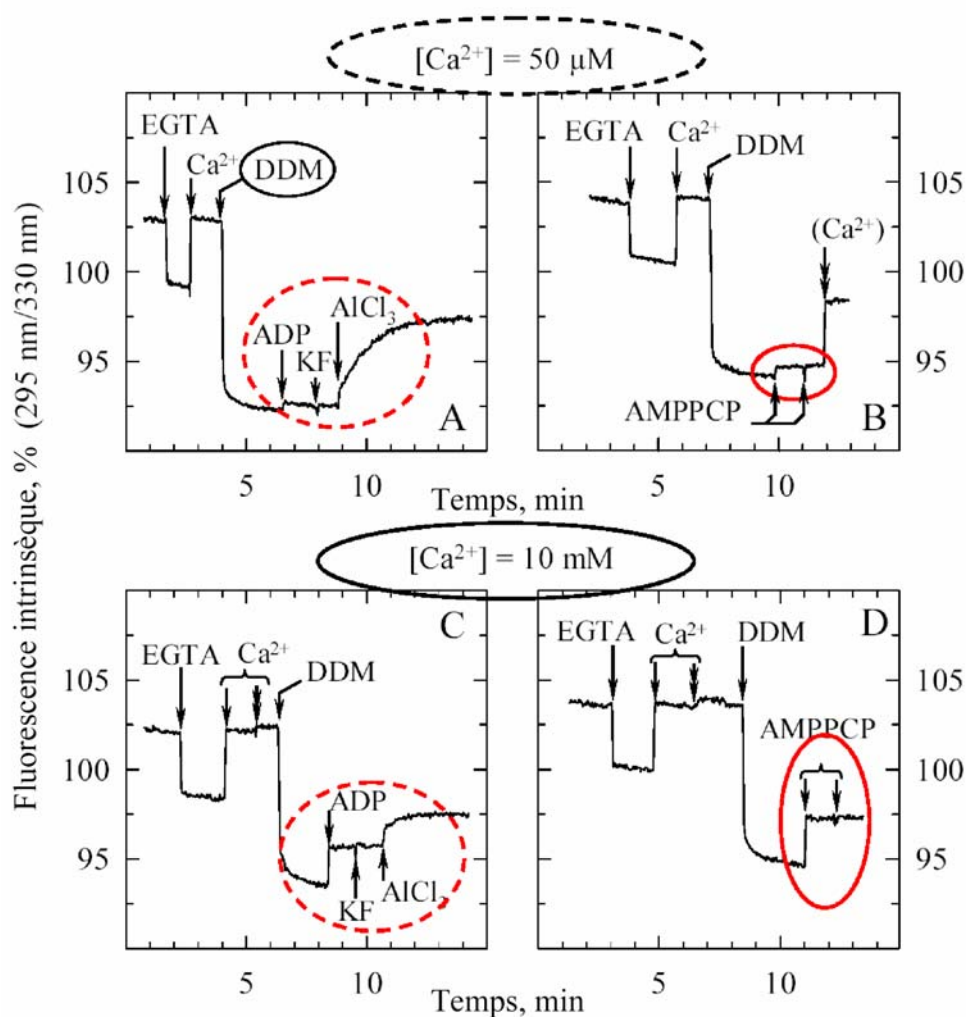


Figure 4. Variations de fluorescence intrinsèque induites par la formation des formes E1.ADP.AIF₄ ou E1.AMPPCP en présence de dodécylmaltoside, à deux concentrations différentes de calcium.

En guise de contrôle préliminaire et de calibrage interne pour chaque mesure, nous ajoutons d'abord 240 μM d'EGTA aux membranes de réticulum, afin de chélater le Ca²⁺ résiduel présent dans nos préparations de réticulum (le Ca²⁺ « endogène ») et aussi le Ca²⁺ qui contamine eau distillée et sels divers (que l'on évalue généralement à quelques micromolaires). Puis, l'addition de 285 μM de Ca²⁺ (la concentration finale de Ca²⁺ libre est alors de l'ordre de 50 μM) permet de saturer les sites Ca²⁺, donc d'induire la formation de la forme E1Ca₂. Dans l'expérience illustrée sur la Figure 4, les vésicules sont également solubilisées avec du détergent (ici du dodécylmaltoside (DDM) à la concentration de 2,5 mg/ml), tout comme dans les expériences réelles de cristallisation.

Nous avons alors ajouté les ligands étudiés. Ou bien (pour les deux panneaux de gauche) 100 μM d'ADP, puis 1 mM de KF et enfin 50 μM d'AlCl₃, ce qui conduit à la formation de l'intermédiaire E1.ADP.AIF₄. Ou bien (pour les deux panneaux de droite) l'AMPPCP, en deux ajouts successifs de 100 μM.

En présence de 50 μM de Ca²⁺ libre (panneaux A & B), les niveaux de fluorescence atteints par les deux formes d'ATPase (E1.ADP.AIF₄ et E1.AMPPCP) sont différents, ce qui signe des conformations différentes. La nette augmentation de fluorescence accompagnant la formation de l'état E1.ADP.AIF₄ (y compris en absence de détergent, résultats non montrés) a une cinétique comparable à l'inhibition de l'activité ATPasique induite par l'ajout de ces mêmes ligands (données non montrées); quant à l'AMPPCP, un premier ajout n'induit qu'un

petit changement de fluorescence ; et le fait que le deuxième ajout ne fasse plus rien témoigne de la saturation du site.

Par contre, lorsqu'on réalise les mêmes additions dans un milieu dans lequel on a préalablement ajouté 10 mM de Ca^{2+} (flèches doubles, panneaux du bas), les signaux observés après addition d'ADP ou d'AMPPCP sont beaucoup plus importants, alors que l'augmentation de fluorescence faisant suite à l'ajout d' AlCl_3 est significativement plus petite. Il en résulte que les niveaux de fluorescence finalement atteints par les deux formes E1.ADP.AIF_4 et E1.AMPPCP sont maintenant beaucoup plus proches.

Ceci va tout à fait dans le même sens que les résultats de protéolyse précédents: en présence de concentrations millimolaires de Ca^{2+} , tout se passe comme si les formes E1.ADP.AIF_4 et E1.AMPPCP adoptaient des conformations beaucoup plus voisines qu'elles ne le sont en présence de concentrations « normales » de Ca^{2+} .

1.4. Evaluation directe de la capacité des sites de fixation du Ca^{2+} à s'ouvrir, lorsque le milieu contient à la fois AMPPCP et fort Ca^{2+} : mesures d'échange $^{45}\text{Ca}^{2+}/^{40}\text{Ca}^{2+}$ par filtration rapide

Nous avons alors entrepris de mesurer directement la capacité à s'ouvrir des sites Ca^{2+} , en reprenant la méthode de filtration rapide utilisée précédemment mais en perfusant désormais les ATPases (avec leurs ions $^{45}\text{Ca}^{2+}$ liés) avec un milieu contenant une forte concentration de calcium non radioactif (pour le distinguer de l'autre) et, éventuellement, de l'AMPPCP.

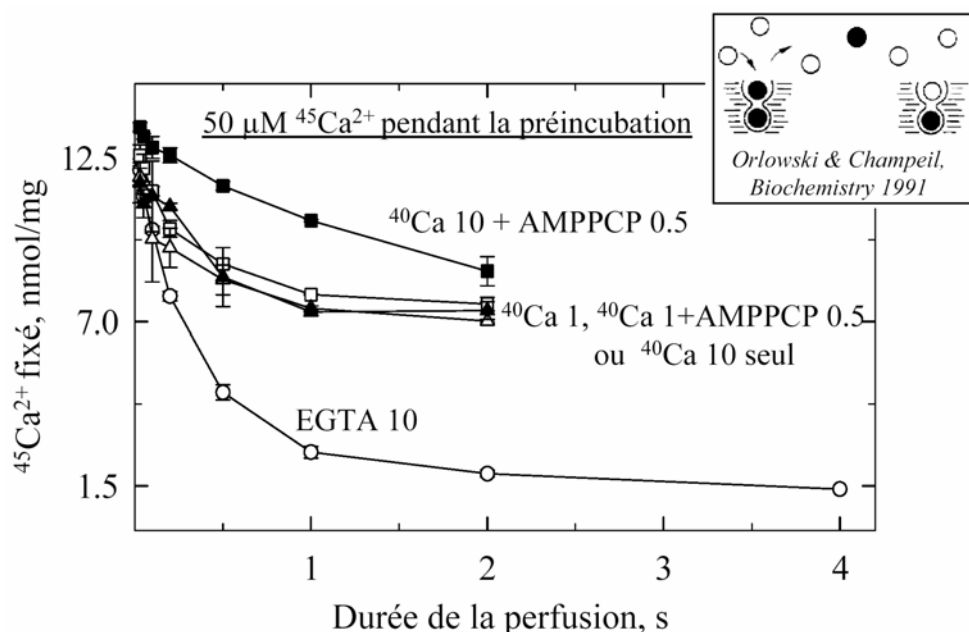


Figure 5. Effet de la concentration en $^{40}\text{Ca}^{2+}$ dans le milieu de perfusion (1 mM ou 10 mM) sur l'échange, en présence ou en absence d'AMPPCP, du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ précédemment fixé

Pour ces expériences, des membranes de SR suspendues dans du Mes-Tris 50 mM, Mg^{2+} 3 mM (pH 6 et 20°C) et préalablement incubées pendant 5-15 minutes en présence de 50 μM de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sont adsorbées sur filtre de nitrocellulose (type HA, Millipore). Lorsqu'on perfuse ce filtre avec une solution d'EGTA (ronds blancs sur la Figure 5), on dissocie les deux ions $^{45}\text{Ca}^{2+}$ avec une cinétique monophasique, comme déjà vu précédemment (Figure 1 de ce chapitre). En revanche, lorsqu'on perfuse le filtre avec une solution contenant du Ca^{2+} non

radioactif, $^{40}\text{Ca}^{2+}$, à 1 mM (triangles) ou 10 mM (carrés vides), la moitié seulement de la radioactivité est éliminée : un tel comportement a déjà été attribué à une disposition en file indienne des deux sites de fixation du Ca^{2+} (voir schéma inséré dans la Figure 5 ; voir aussi Figure 11 du chapitre III), le seul $^{45}\text{Ca}^{2+}$ susceptible de s'échanger contre du $^{40}\text{Ca}^{2+}$ étant celui fixé au site « superficiel ». Mais, point important, la constante de vitesse de dissociation de ce site superficiel, évaluée dans le cadre d'un schéma de dissociation séquentielle, ne semble pas différente si on la mesure en présence d'EGTA ou si on la mesure en présence de calcium, que ce soit 1 ou même 10 mM (Orlowski and Champeil 1991) (voir Introduction, Fonctionnement de SERCA, paragraphe 4). Cette capacité qu'a le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ superficiel à s'échanger traduit la vitesse de dissociation intrinsèque du calcium lié à ce site, la « fréquence d'ouverture » de la porte qui barre ce site, qui n'est pas affectée par la concentration de Ca^{2+} à l'extérieur. Cette vitesse de dissociation, cette fréquence d'ouverture, n'est pas non plus affectée par la présence d'AMPPCP en présence de Ca^{2+} modéré (même déjà égal à 1 mM, triangles pleins).

Par contre, la présence simultanée de 10 mM de Ca^{2+} et d'AMPPCP retarde de manière significative la dissociation du Ca^{2+} superficiel (carrés pleins). On observe donc directement une authentique « tendance à l'occlusion » en présence d'AMPPCP, *mais seulement en présence de concentrations très fortes de $^{40}\text{Ca}^{2+}$* .

1.5. Conclusion

Nous avons montré que contrairement à ce qui est suggéré par la structure cristallographique obtenue en présence d'AMPPCP, la simple fixation du nucléotide n'induit pas l'occlusion des ions Ca^{2+} au sein de leurs sites.

Notons cependant que parmi tous les analogues d'ATP, l'AMPPCP a une propriété un peu particulière : la dépendance en Mg^{2+} de son affinité est inverse de celle des autres nucléotides, puisque son affinité est moins bonne en présence de Mg^{2+} qu'en absence de Mg^{2+} . De ce point de vue là, d'autres nucléotides, comme l'ATP γ S ou l'AMPPNP, auraient peut-être pu faire de meilleurs analogues (quoique l'ATP γ S ne soit probablement pas lui non plus le meilleur candidat, puisqu'il a été décrit que cet analogue induit une lente thio-phosphorylation de l'ATPase (Yasuoka et al. 1982)). Nous avons alors comparé l'effet de plusieurs nucléotides sur la vitesse de dissociation de Ca^{2+} . Mais nous avons trouvé qu'aucun d'entre eux ne la bloque : cf Figure 1, panneau C dans l'article joint (Picard et al. 2005b).

Notre conclusion ci-dessus vaut donc sans doute au-delà du seul cas de l'AMPPCP. Quant à l'ATP lui-même, il avait déjà été suggéré que la fixation de $\text{Mg}.\text{ATP}$ *accélérait* légèrement la dissociation des ions Ca^{2+} (Petithory and Jencks 1988). De plus, la *fixation* de Ca^{2+} sur l'ATPase est elle aussi accélérée en présence de divers nucléotides, dont l'AMPPCP (Mintz et al. 1995), ce qui est difficilement conciliable avec l'idée que dans ces conditions-là les sites seraient occlus. Le plus probable est donc bien que l'événement d'occlusion ait lieu plus tard dans le cycle, vraisemblablement au moment de la phosphorylation, ou plus précisément au moment de la formation de l'état de transition qui précède cette phosphorylation et dont la forme E1.ADP.AIF_4 est justement l'analogue, comme le suggèrent les données expérimentales (Troullier et al. 1992) et cristallographiques (Sørensen et al. 2004; Toyoshima and Mizutani 2004).

Au-delà des propriétés d'occlusion qui différencient les formes E1.ADP.AIF_4 et E1.AMPPCP en solution, qui pourraient *a priori* n'être que la traduction d'une plus ou moins grande flexibilité de la protéine autour de sa conformation moyenne, il nous semble en outre que la conformation *moyenne* de la chaîne polypeptidique est nécessairement *différente* dans

les formes E1.ADP.AIF₄ et E1.AMPPCP en solution. L'argument le plus fort pour conclure cela nous semble être la différence des niveaux de fluorescence intrinsèque des formes E1.ADP.AIF₄ et E1.AMPPCP en solution (je reviendrai là-dessus dans la conclusion générale). Du coup, il semble bien que cette conformation *moyenne* de la chaîne polypeptidique dans le complexe E1.AMPPCP en solution doive être *différente* de celle trouvée dans la forme cristalline « E1.AMPPCP » (en postulant que la forme E1.ADP.AIF₄, qui montre l'occlusion attendue, n'a pas souffert de la cristallisation).

L'ATPase adopte dans le cristal E1.AMPPCP une structure polypeptidique dans laquelle le nucléotide, quant à lui, a une conformation étendue. Cette conformation étendue est indispensable pour que le phosphate γ du nucléotide puisse être positionné correctement face à l'aspartate catalytique au moment de la phosphorylation ultérieure, et pour assurer les contacts entre les domaines N et P. Mais en solution, un nucléotide peut évidemment adopter une multitude de conformations. Et dans son site de fixation, il a été suggéré que le nucléotide pourrait adopter une conformation semi-repliée; dans la structure polypeptidique correspondante, les ions Ca²⁺ se dissocieraient librement de leurs sites (Ma et al. 2003). En effet, des expériences de coupures en présence de Fe²⁺ et d'eau oxygénée (catalysant la formation de radicaux libres après réaction de Fenton) ont montré que les résidus Thr441 et Glu439 du domaine N sont situés tout près du site occupé par le Fe²⁺, c'est à dire (selon la logique de ces expériences) du site normalement occupé par le Mg²⁺ (Montigny et al. 2004). Or le nucléotide doit adopter une conformation un peu repliée pour que la coupure par un Fe²⁺ complexé à la chaîne phosphate du nucléotide puisse effectivement avoir lieu au niveau des résidus Thr441 et Glu439. Il nous semble donc tout à fait possible que l'ATPase en solution accepte son nucléotide sous deux (voire plus) conformations différentes, en équilibre plus ou moins favorable, et associées à des structures différentes de la chaîne polypeptidique: une structure polypeptidique où le nucléotide est replié, structure laissant les sites Ca²⁺ transitoirement accessibles, et une structure de la chaîne polypeptidique où le nucléotide a sa conformation étendue, structure dans laquelle l'ATPase se réorganise de manière à être prête à occlure les sites Ca²⁺ à l'étape immédiatement suivante (la phosphorylation).

Ce ne serait pas la première fois que des conditions de cristallisation particulières auraient sélectionné une structure non majoritaire en solution et pas forcément représentative d'un point de vue fonctionnel. De tels effets sont bien connus des cristallographes mais nous semblent mériter d'être soulignés, car ils nous engagent à ne pas sur-interpréter les structures tridimensionnelles que nous avons la chance de pouvoir désormais découvrir. Dans le cas présent, le cristal E1.AMPPCP révélerait ainsi une conformation sans doute minoritaire mais extraordinairement intéressante, puisque c'est celle de l'état de transition adopté par l'enzyme lors de la phosphorylation.

Résumons : nous avons montré qu'en présence d'AMPPCP, l'ATPase a des propriétés différentes selon que le milieu contient 10 mM de Ca²⁺ ou qu'il contient une concentration micromolaire « normale » de Ca²⁺: l'ATPase devient plus résistante à la protéinase K, elle semble adopter une conformation plus ressemblante à celle du complexe E1.ADP.AIF₄, et enfin et surtout, son Ca²⁺ superficiel semble avoir plus de difficulté à se dissocier. Ces résultats ne montrent pas d'occlusion de Ca²⁺ à proprement parler, mais ils favorisent très fortement l'idée que la conformation adoptée par l'enzyme en solution en présence de Ca²⁺ fort est *différente* de celle trouvée dans les conditions ordinaires, et se rapproche de la conformation trouvée dans le cristal. D'ailleurs, à très forte concentration de Ca²⁺, l'affinité de l'ATPase pour l'AMPPCP change (elle augmente, voir Figure 2 dans (Picard et al. 2005b)). Mais pourquoi une concentration de Ca²⁺ très élevée favoriserait-elle une structure plutôt qu'une autre?

Lors de la publication de ces résultats (Picard et al. 2005b), nous discutons deux hypothèses pour interpréter cet effet. Dans une première hypothèse, nous imaginions qu'en présence d'une concentration de Ca^{2+} élevée, l'ATPase avait pu fixer un Ca^{2+} supplémentaire (en plus des ions Ca^{2+} fixés au site de transport), par exemple au site catalytique, à la place du Mg^{2+} . Dans ces conditions, les propriétés de cette espèce particulière seraient naturellement différentes des propriétés de l'espèce que nous manipulons en solution, parce que à substrat différent (Mg^{2+} .AMPPCP ou au contraire Ca^{2+} .AMPPCP), propriété possiblement différente (dissociation facile ou au contraire occlusion des Ca^{2+}). Une deuxième hypothèse consistait à imaginer que la conformation repliée du nucléotide était acceptée par l'ATPase pour le Mg^{2+} .AMPPCP, mais pas pour le Ca^{2+} .AMPPCP. En présence d'une concentration élevée de Ca^{2+} , on favoriserait le Ca^{2+} .AMPPCP, donc une conformation étendue de l'AMPPCP et le repliement polypeptidique qui va avec. La première hypothèse était séduisante pour nous, mais elle se heurtait au fait que la densité électronique résiduelle au site catalytique de l'enzyme avait été attribuée à un ion Mg^{2+} , et non pas à un ion Ca^{2+} , et ce à la fois dans la structure de C. Toyoshima (1VFP) et dans celle de P. Nissen (1T5S). Cette attribution avait été faite sur la base des coordinations du métal avec les résidus environnants et des différents facteurs d'agitation thermique.

Nos résultats ont bien sûr donné lieu à intense correspondance avec C. Toyoshima et P. Nissen. L'hypothèse d'une présence de Ca^{2+} au site catalytique, donc d'une interprétation initiale partiellement erronée de la nature de ce métal, s'est trouvée renforcée par l'observation faite par P. Nissen (Nissen, communication personnelle) de taches de diffusion « anormale » suggérant la présence effective de Ca^{2+} au site catalytique dans le cristal E1.AMPPCP, mais pas dans le cristal E1.ADP.AIF₄ (la diffusion anormale est particulièrement sensible au numéro atomique, et elle est significativement plus forte pour le Ca^{2+} que pour le Mg^{2+}). Depuis, j'ai eu la chance de pouvoir faire un séjour de quelques semaines dans le laboratoire de Poul Nissen, au printemps 2005. J'ai pu cristalliser l'ATPase en présence d'AMPPCP et toujours en présence de 10 mM de Ca^{2+} , mais maintenant en absence totale de Mg^{2+} , et les premiers cristaux obtenus ont déjà donné des cartes de diffraction satisfaisantes. Nous avons alors construit des cartes de différence de densité électronique entre les deux types de cristaux, obtenus ou bien en présence de Mg^{2+} (Sørensen et al. 2004; Toyoshima and Mizutani 2004) ou bien en absence de Mg^{2+} (les nôtres), et n'avons trouvé absolument aucune différence (Picard et al., en préparation). Ces résultats suggèrent fortement que dans les premiers cristaux E1.AMPPCP, c'était bien sans doute un Ca^{2+} qui était lié à l'AMPPCP dans le site catalytique, et non pas un Mg^{2+} . C'est sans doute ce Ca^{2+} inattendu, et non pas la seule fixation de nucléotide, qui entraînait l'ATPase vers une structure occluant le calcium. Nos mesures conformationnelles, pour limitées qu'elles soient, auront permis de rectifier cela.

2. Effet de la présence d'inhibiteurs de l'ATPase sur l'accessibilité luminale des sites Ca^{2+} dans les formes « E2P-like » (Manuscrit # 4)

Pour les raisons de stabilité que nous avons évoquées précédemment, tous les cristaux de SERCA en absence de Ca^{2+} publiés à ce jour ont été obtenus en présence d'inhibiteurs. Initialement, c'est la thapsigargine qui a été utilisée, pour la structure 1IWO d'abord, obtenue « simplement » en absence de Ca^{2+} (Toyoshima and Nomura 2002), puis pour la structure 1WPG, obtenue en présence de MgF_4 (Toyoshima et al. 2004) et pour la structure 1XP5, obtenue en présence d' AlF_4 (Olesen et al. 2004). La thapsigargine est une molécule isolée d'une plante : *Thapsia garganica* L.; elle appartient à la famille des sesquiterpènes lactones, et elle semble influencer sur les processus de cancérisation (Treiman et al. 1998). Il a été montré très vite que son action sur l'ATPase reposait sur sa fixation à la conformation « E2 » de l'ATPase, avec une affinité nanomolaire (Sagara et al. 1992). Par la suite il a été montré que la thapsigargine se fixait dans le domaine transmembranaire de l'ATPase, compromettant de ce fait la fixation des ions Ca^{2+} (Zhong and Inesi 1998; Toyoshima and Nomura 2002; Xu et al. 2004). Tout récemment, une forme cristalline de l'ATPase en absence de Ca^{2+} a été également obtenue en présence de TG et d'un autre inhibiteur de la fixation du Ca^{2+} , le BHQ (Obara et al. 2005). Les cristaux obtenus en présence de ces deux inhibiteurs ont pour l'essentiel confirmé la structure initiale, et ont en fait permis d'atteindre une meilleure résolution que celle (Toyoshima and Nomura 2002) obtenue en présence de TG seule. Il n'est cependant pas illégitime de poser la question de la pertinence des structures obtenues en présence de ces différents inhibiteurs.

Plus spécifiquement, nous nous sommes intéressés aux formes d'ATPase obtenues en absence de Ca^{2+} mais en présence de composés fluorés, et nous avons voulu évaluer dans quelle mesure la fixation de ces inhibiteurs dans la partie transmembranaire de l'ATPase pouvait avoir perturbé le passage des ions Ca^{2+} entre leurs sites de fixation et la lumière du réticulum sarcoplasmique. Les différentes structures obtenues en absence de Ca^{2+} et en présence de ces inhibiteurs ne révèlent pas clairement ce passage. De plus, une controverse existe concernant le moment du cycle où l'ouverture des sites vers le milieu luminal se produit (Olesen et al. 2004; Toyoshima et al. 2004). L'objectif de ce travail était de trouver des conditions expérimentales permettant de définir à quel moment du cycle (ou tout au moins dans quelle forme fluorée) cette ouverture des sites vers le milieu luminal est la plus évidente, et simultanément d'évaluer l'effet des inhibiteurs cités précédemment sur cette accessibilité luminale des sites Ca^{2+} . Cette ouverture des sites de transport vers le côté luminal, couplée à une diminution de leur affinité pour le Ca^{2+} , est un événement primordial pour que le transport actif des ions Ca^{2+} (contre leur gradient de concentration) puisse avoir lieu (cf Introduction).

Les complexes fluorés de l'ATPase que l'on peut former en absence de Ca^{2+} n'ont plus d'activité ATPasique, et sont supposés figer l'ATPase dans une conformation plus ou moins proche de celle du dérivé phosphorylé « E2P ». Une étude de 2004 (Danko et al. 2004) avait déjà montré que le complexe formé en présence de fluorure de béryllium, E2.BeF_x (sans doute E2.BeF_3), avait ses sites Ca^{2+} raisonnablement accessibles du côté luminal (ce résultat n'était toutefois basé que sur des expériences indirectes de réactivation de l'activité ATPasique en présence de Ca^{2+}) et représentait probablement le meilleur analogue de la forme E2P. A l'inverse, les complexes formés en présence de fluorure d'aluminium ou en présence de fluorure de magnésium (E2.AlF_4 ou E2.MgF_4) semblaient avoir leurs sites Ca^{2+} beaucoup moins accessibles et représentaient sans doute des analogues de l'état de transition adopté par l'ATPase au moment de sa déphosphorylation ou du complexe ternaire non

covalent E2.Pi. Ces différentes conformations sont représentées Figure 6. Dans cette Figure, les composés représentés en rouge sont ces deux dernières formes, dont les structures cristallines ont été publiées depuis.

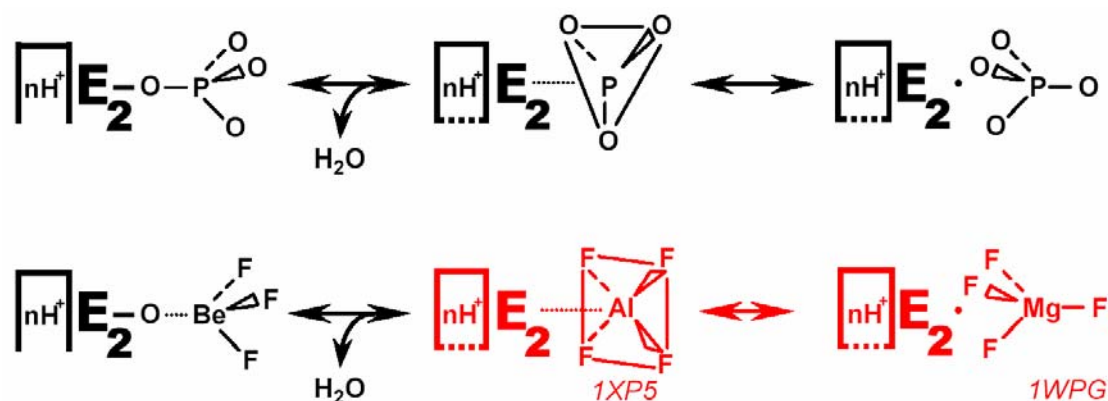


Figure 6. Représentations schématiques des conformations adoptées par SERCA lors de la déphosphorylation, et en présence des inhibiteurs supposés mimer ces mêmes conformations.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les propriétés de fluorescence de ces différents intermédiaires fluorés, afin d'évaluer (ou de confirmer) la fidélité avec laquelle ils miment les intermédiaires réactionnels physiologiques. Puis, et surtout, nous avons mis au point un protocole permettant de mesurer de manière non ambiguë une éventuelle fixation luminale de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sur ces différents composés fluorés. Une seule tentative avait jusque là été faite dans ce sens (Vieyra et al. 2004). Ce protocole, que nous présenterons dans un deuxième temps, nous a permis de démontrer que la forme E2.BeF_x présente bien ses sites ouverts du côté luminal de l'ATPase, disponibles pour une fixation rapide du Ca^{2+} (et à faible affinité), alors que ce n'est pas le cas pour les formes E2.AlF_4 et E2.MgF_4 . Nous avons simultanément pu mettre en évidence que la fixation de la thapsigargine (et de deux autres inhibiteurs), utile pour cristalliser l'ATPase en absence de Ca^{2+} , referme malheureusement cet éventuel accès luminal aux sites Ca^{2+} .

2.1. Fluorescence intrinsèque des différents complexes fluorés

L'expérience illustrée par la Figure 7 montre les variations de fluorescence dues à la formation des complexes E2.AlF_4 (Figure 7, panneaux A et C) ou E2.BeF_x (Figure 7, panneaux B et D).

Les vésicules de SR ont été suspendues (à 0,1 mg/ml de protéine) dans un tampon Mops-Tris 50 mM (pH 7 et 20°C), Mg^{2+} 5 mM, KCl 100 mM. Nous avons formé les complexes fluorés grâce à l'ajout successif de 250 μM d'EGTA et 1 mM de KF, puis 50 μM d' AlCl_3 (panneaux A et C) ou 50 μM de BeCl_2 (panneaux B et D) ; pour les expériences représentées dans les panneaux C et D, 4 $\mu\text{g/ml}$ de A23187 ont été également ajoutés, avant l'addition d'EGTA. A la fin de chacune des mesures, nous avons ajouté plusieurs fois 1 $\mu\text{g/ml}$ de TG (la première addition est réputée suffisante pour saturer l'ATPase: 1 $\mu\text{g/ml}$ de TG correspond approximativement à 1,5 μM de TG alors que 0,1 mg/ml de SR correspond à 0,5 à 0,7 μM d'ATPase). Les longueurs d'onde ont été fixées à 295 nm à l'excitation et 315 nm à l'émission (avec des largeurs de fente de 2 et 10 nm respectivement).

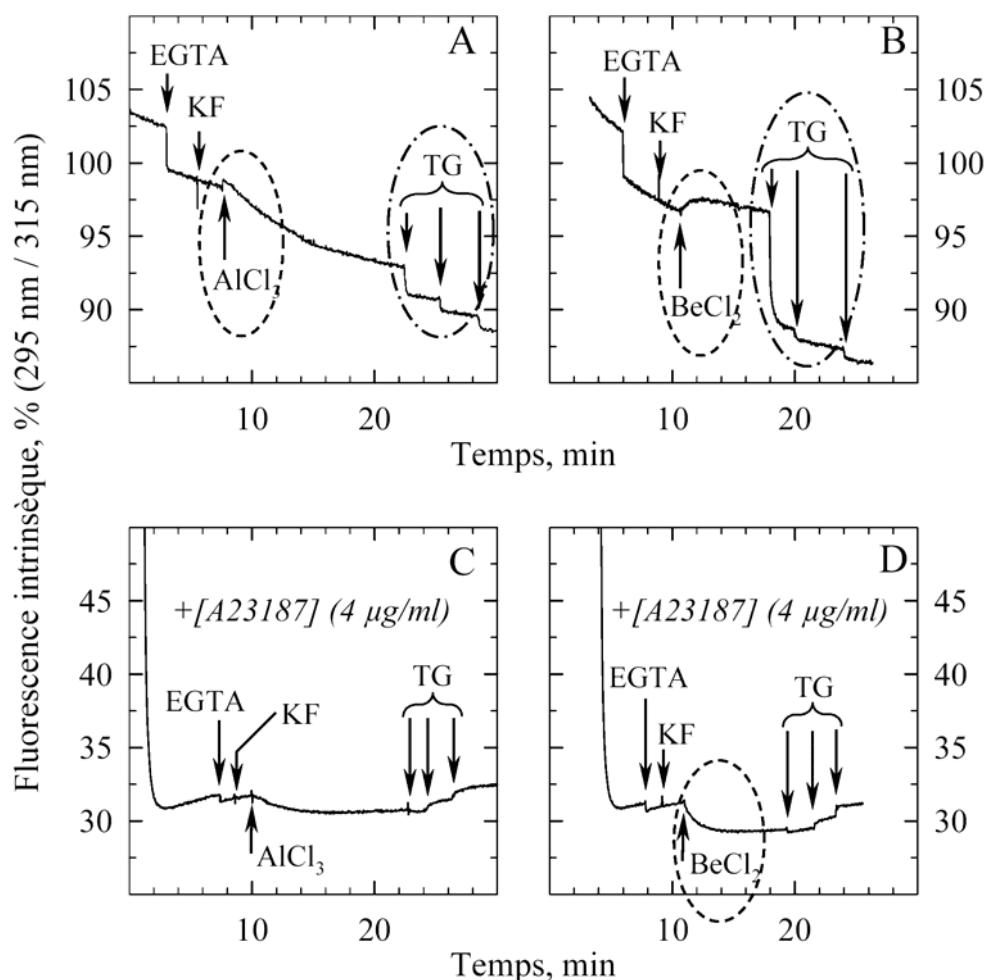


Figure 7. Changements de fluorescence intrinsèque consécutifs à la formation des formes $E2.AIF_4$ et $E2.BeF_x$, en présence ou en absence d'ionophore. Effet de l'ajout de TG sur ces formes.

Le panneau A de la Figure 7 confirme que la formation du complexe $E2.AIF_4$ s'accompagne d'une diminution lente de la fluorescence (Troullier et al. 1992) et que l'ajout de TG induit une diminution de fluorescence relativement faible (Sagara et al. 1992; Danko et al. 2004). Au contraire, la formation du complexe $E2.BeF_x$ (panneau B) conduit à une *augmentation* de la fluorescence, avec une cinétique correspondant à la cinétique d'inhibition de l'activité ATPasique de l'enzyme après ajout des mêmes composés (voir une semblable inhibition, dans des conditions légèrement différentes, sur la Figure 8 ci-dessous). Danko et collaborateurs ont mis en évidence qu'une addition de TG sur $E2.BeF_x$ induit une chute de fluorescence plus grande que celle observée lors du même ajout sur une enzyme incubée en présence d'EGTA seul ou en présence d'autres espèces fluorées ; nous confirmons ici ce résultat (comparer l'effet de l'addition de TG sur $E2.AIF_4$, panneau A et sur $E2.BeF_x$, panneau B).

Lorsqu'on réalise les mêmes expériences mais après avoir préalablement ajouté du A23187 (qui « éteint » en partie, par transfert d'énergie (de Förster), la fluorescence des résidus Trp proches de la membrane), la diminution de la fluorescence observée lors de la formation du complexe $E2.AIF_4$ est toujours visible, alors que l'augmentation de la fluorescence précédemment observée lors de la formation du complexe $E2.BeF_x$ est maintenant convertie en une diminution. De plus, dans ces conditions, l'addition de TG ne fait plus grand-chose sur $E2.BeF_x$.

Ces mesures de fluorescence confirment l'hypothèse faite par Danko et collaborateurs (Danko et al. 2004), hypothèse selon laquelle la forme $E2.BeF_x$ est le meilleur analogue de la

forme E2P. En effet, elles montrent que la forme E2BeF_x a des propriétés analogues à celles de E2P:

- i) En absence de A23187, la formation du complexe E2.BeF_x induit une augmentation de fluorescence, tout comme la formation du dérivé phosphorylé E2P (Lacapère et al., 1981). La TG induit une chute de la fluorescence plus grande pour l'espèce E2.BeF_x que pour l'espèce E2AlF₄, ce qui est aussi le cas pour la forme E2P (ceci avait déjà été interprété par (Danko et al. 2004) comme étant compatible avec l'ouverture luminale des sites pour E2P ou E2.BeF_x et non pour E2.AlF₄, mais sans trop de justification à notre avis). Mentionnons au passage que nous avons aussi étudié les variations de fluorescence intrinsèque consécutives à l'addition de *BHQ* sur les formes E2.BeF_x ou E2.AlF₄ et nous sommes arrivés au même résultat qu'avec la TG : ces inhibiteurs induisent tous les deux un quenching de fluorescence plus important pour E2.BeF_x que pour E2.AlF₄.
- ii) En présence de A23187, la formation du complexe E2.BeF_x s'accompagne d'une baisse de la fluorescence (alors que la formation de ce même complexe en absence du A23187 conduit à une augmentation de la fluorescence). La même observation a déjà été faite pour E2P (Champeil et al. 1986; de Foresta et al. 1990).
- iii) Une addition de 300 μM de Ca²⁺ n'a pas d'effet sur la fluorescence de E2.BeF_x (voir Supplemental Material de l'article ci-joint). Ceci nous conforte dans l'idée que E2.BeF_x est un bon analogue de E2P car l'enzyme phosphorylée est supposée avoir réorienté ses sites: ils ne sont plus accessibles du côté cytosolique (cf Chapitre « Fonctionnement de SERCA1a », *Figure 2*). D'autre part, la formation de E2.BeF_x n'est possible qu'en présence de Mg²⁺, ce qui est aussi le cas pour la forme E2P (Lacapère et al. 1981).
- iv) Nous avons également étudié les changements de fluorescence, en présence de composés fluorés, d'une ATPase préalablement incubée en présence de protéinase K dans des conditions aboutissant à la formation très majoritaire d'un complexe p28N/p83C, où la coupure a eu lieu dans le segment reliant le segment transmembranaire M3 et le domaine A (Møller et al. 2002). Comme déjà décrit dans un chapitre précédent, ce complexe reste phosphorylable par l'ATP, mais n'est plus phosphorylable par le Pi. Nous avons observé que l'ajout de béryllium fluorure sur p28N/p83C en absence de Ca²⁺ n'a aucun effet sur la fluorescence intrinsèque, alors que l'ajout d'ADP et de fluoroaluminate en présence de Ca²⁺ sur ce même complexe protéolytique aboutit bien à une augmentation de la fluorescence (résultats non montrés).

2.2. Mesures de la fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ du côté luminal, après réaction de l'ATPase avec les fluorures

Avant toute chose, nous avons évalué la cinétique de formation des différents complexes fluorés, en suivant l'inhibition de l'activité ATPasique au cours du temps en présence de différents mélanges fluorés (Figure 8).

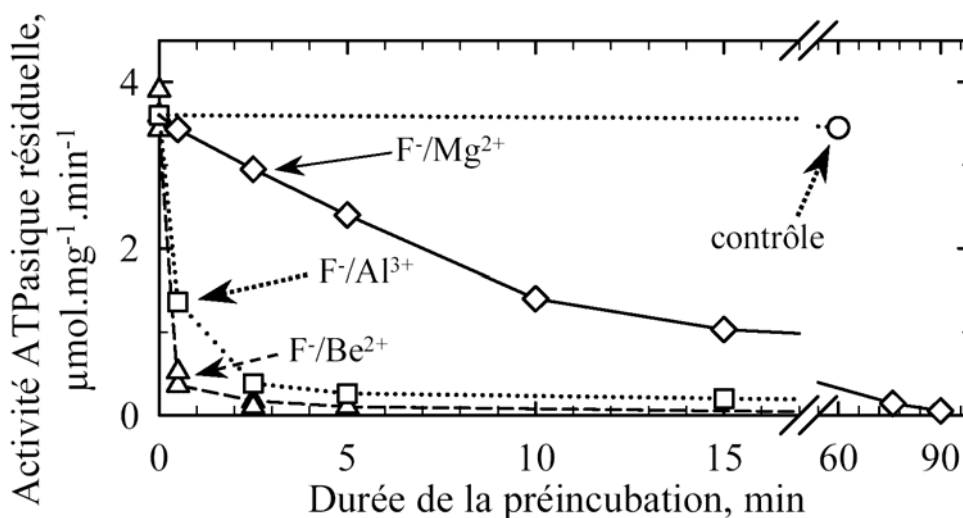


Figure 8. Cinétiques d'inhibition de l'activité ATPasique en présence de fluorure de béryllium (triangles), d'aluminium (carrés) ou de magnésium (losanges), ou encore dans des conditions contrôles (ronds).

Pour ces expériences et les suivantes, le milieu de préincubation contenait Mops-Tris 50 mM (pH 7, 20°C), KCl 100 mM, Mg^{2+} 5 mM, EGTA 250 μM et DMSO 20 % (v/v), et nous lui ajoutons les différents composés fluorés: 1 mM de KF seul (conduisant à la formation de la forme E2.MgF_4 , symbole losange), ou bien 1 mM de KF en présence de 50 μM d' AlCl_3 (afin de former la forme E2.AlF_4 , symbole carré), ou encore en présence de 50 μM de BeCl_2 (d'où la formation de la forme E2.BeF_x , symbole triangle). La réaction était déclenchée par l'ajout de SR de concentration 3 mg/ml, et périodiquement, des aliquots de 4 μl étaient dilués dans 2 ml du milieu d'activité ATPasique décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes. L'activité ATPasique résiduelle en fonction de la durée de la préincubation est montrée sur la Figure 8, et confirme qu'une inhibition complète de l'ATPase peut être atteinte après un temps de préincubation qui dépend du composé fluoré considéré.

Nous avons ensuite mesuré par filtration la quantité de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fixée sur l'enzyme inhibée par les dérivés fluorés. Afin de réaliser ce type de mesure, il nous a fallu prendre les précautions suivantes.

- Tout d'abord, nous avons réalisé ces mesures de fixation en présence d'un ionophore à Ca^{2+} , afin que le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ajouté dans le milieu puisse atteindre des sites situés du côté luminal des vésicules (avec des contrôles en absence d'ionophore, pour pouvoir discriminer une fixation qui aurait lieu du côté cytosolique d'une fixation qui aurait lieu à partir de la lumière des vésicules, voir plus loin).

- Il a fallu aussi trouver un moyen de discriminer la fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sur l'ATPase de toute fixation que nous qualifierons de « non spécifique », c'est-à-dire sur des phospholipides négatifs ou sur des protéines autres que l'ATPase (classiquement, on décrit par exemple que la calséquestrine, présente à l'intérieur des vésicules de SR dans nos préparations, peut fixer une grande quantité d'ions calcium avec une mauvaise affinité)... Dans un premier temps, c'est à cela qu'a servi la thapsigargine (TG) : nous avons admis qu'au moins en absence de composé fluoré, la fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sur l'ATPase était impossible en présence de cet inhibiteur: toute

fixation observée en présence de TG sur une ATPase initialement en E2 sera donc considérée comme non-spécifique de l'ATPase- Ca^{2+} (voir aussi plus loin).

- Les sites de fixation du Ca^{2+} ont *a priori* une mauvaise affinité lorsqu'ils sont orientés du côté luminal. Or les mesures de fixation de Ca^{2+} radioactif nous imposent de rester dans des gammes de concentrations de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ assez basses pour que le rapport signal (fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$) sur bruit (fixation non spécifique et $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mouillant le filtre) reste raisonnable. Nous avons donc choisi de nous placer à pH alcalin afin d'améliorer cette affinité luminale de l'ATPase pour le Ca^{2+} (de Meis et al. 1980).

- Enfin ces mesures de la fixation de Ca^{2+} peuvent devenir ambiguës si les complexes fluorés ne sont pas suffisamment stables. Nous avons choisi de pratiquer nos mesures en présence de 20 % de DMSO, une concentration qui s'est avérée stabiliser la forme E2.BeFx, comme cela a déjà été montré pour la « vraie » forme E2P (de Meis et al. 1980).

Dans une première série d'expériences, nous avons suivi la fixation de Ca^{2+} pendant des durées relativement courtes, de l'ordre de quelques dizaines de secondes (Figure 9).

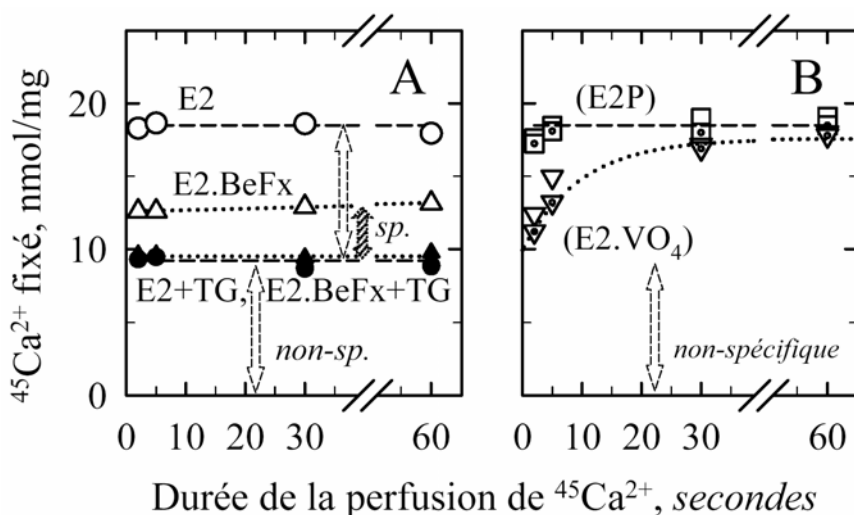


Figure 9. Cinétiques de fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sur des ATPases dépourvues de Ca^{2+} , contrôles (ronds) ou préincubées en présence de divers ligands (voir texte). Juste avant le dépôt sur filtre et la perfusion de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, on a ajouté (symboles pleins du panneau A) ou non (symboles vides) de la TG.

Ces expériences ont consisté à former les complexes souhaités (ici E2, E2.BeFx, E2P et E2.VO₄), à les déposer sur un filtre de nitrocellulose puis à les perfuser avec du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ pendant des temps courts (quelques secondes). La radioactivité sur le filtre est alors comptée directement, sans rinçage : on évalue la quantité de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fixé à ces différents types d'ATPase en soustrayant la quantité de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mouillant de la radioactivité totale.

Concrètement, nous avons préincubé l'ATPase (à la concentration de 0,3 mg/ml) en présence d'ionophore (0,003 mg/ml) dans le milieu d'incubation décrit précédemment Figure 8, en absence de toute autre chose (ronds) ou bien en présence de 1 mM de KF et 50 μM de BeCl_2 (formation de E2.BeFx, triangles), ou en présence de 1 mM (carrés) ou 3 mM (carrés pointés) de Pi (formation de la forme E2P), ou encore en présence de 1 mM d'orthovanadate (triangles inversés) ou de décavanadate (triangles inversés pointés). Les vésicules ont été préincubées pendant 30 minutes, puis déposées (2 ml de SR, *i.e.* 0,6 mg de protéine) sur un filtre de nitrocellulose (filtre Millipore GS) et enfin perfusées (manuellement) immédiatement, pendant des temps choisis, avec un milieu de fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ contenant Tes-Tris 100 mM (pH 8, 20°C), KCl 100 mM, Mg^{2+} 5 mM, DMSO 20 %, 200 μM de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et 200 μM de [^3H]glucose). Pour la moitié des échantillons environ, nous avons ajouté 0,003 mg/ml de TG après préincubation, juste avant de déposer sur le filtre de nitrocellulose.

La quantité de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mesurée pour le contrôle (« E2 ») en *présence* de TG est de 8-9 nmol/mg de protéine (Figure 9 A, ronds noirs): cela correspond à la fixation «non spécifique» de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ à l'extérieur des vésicules ou sur la calséquestrine interne (cette fixation non spécifique est d'autant plus importante que l'on se place à pH alcalin). En *absence* de TG, la radioactivité fixée totale sur l'ATPase initialement en E2 est de l'ordre de 18 à 19 nmol de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ par mg de protéine (Figure 9 A, ronds blancs). Par différence, la quantité de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ effectivement fixée à l'ATPase initialement en E2 est donc de l'ordre de 10 nmol de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ par mg de protéine, ce qui est cohérent avec les valeurs données classiquement dans la littérature (Inesi et al. 1980; Orłowski and Champeil 1991). Dans le cas d'une ATPase préincubée en présence de fluorure de béryllium, la quantité de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fixée en plus du non-spécifique est inférieure à celle mesurée pour l'ATPase préincubée en EGTA seul mais cette quantité est toutefois non négligeable: c'est notre mesure de la fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sur la forme E2.BeF_x (Figure 9 A, triangles blancs).

Ces interprétations sont basées sur le postulat, énoncé ci-dessus, que la fixation de Ca^{2+} sur une ATPase initialement en E2 est impossible en présence de TG. On pourrait peut-être nous objecter que Wictome et collaborateurs ont montré que l'effet de la TG n'était pas vraiment *d'empêcher* la fixation de Ca^{2+} mais seulement de diminuer l'affinité de l'ATPase pour le Ca^{2+} dans sa conformation E2 et de ralentir la vitesse de fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence de TG (ce qui sous-entend que cette fixation peut quand même avoir lieu). Nous pensons que les expériences que nous venons de présenter résistent à ce type d'objection, car la fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ que nous observons en présence de TG est réalisée en quelques secondes, alors que celle observée par Wictome et collaborateurs, dans leurs conditions pourtant sans DMSO, était de l'ordre de quelques minutes.

Un autre argument pourrait aussi être avancé pour expliquer d'une autre façon la fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sur la forme E2BeF_x. Comme nous l'avons dit précédemment, nous avons fait en sorte d'incuber les vésicules de SR dans des conditions pour lesquelles les complexes fluorés sont les plus stables possibles. Toutefois, il pourrait nous être opposé que cette fixation ne résiste pas à la perfusion avec la concentration de Ca^{2+} relativement élevée (200 μM) que nous avons utilisée. Si tel était le cas, il suffirait qu'une petite proportion d'enzyme perde son ligand BeF_x, et par conséquent revienne à son état E2, pour expliquer une fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Cependant, l'observation d'une fixation rapide mais d'amplitude limitée sur la forme E2.BeF_x nous conforte dans notre interprétation initiale, puisque dans nos conditions le filtre est perfusé en continu et donc tout fluorure relargué est éliminé : si la dissociation de fluorure se faisait rapidement, elle devrait être totale.

Une semblable possibilité est néanmoins présente dans d'autres cas de figure, comme illustré par les expériences reportées Figure 9B (triangles à l'envers): nous y observons la cinétique de fixation du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sur une ATPase préincubée en présence de vanadate, et là, cette cinétique révèle qu'il y a déstabilisation du vanadate au cours du temps (comme on le verra aussi plus loin grâce à des mesures de réactivation de l'ATPase). La fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sur une ATPase initialement en E2P (Figure 9B, carrés) est plus ambiguë, mais, après examen, elle relève de la même logique : les conditions utilisées dans cette expérience ne stabilisent pas assez la forme E2P, qui est déstabilisée dès les premières secondes comme on peut le voir par ailleurs dans des expériences classiques de déphosphorylation (résultats non montrés).

Dans les cas des complexes avec les fluorures (ou le vanadate), pour contrôle, nous avons mesuré la vitesse de réactivation de l'activité ATPasique à partir de la mise en contact du complexe avec le Ca^{2+} (Figure 10). Ces expériences ont consisté à incuber des vésicules dans les milieux d'inhibition par les fluorures (ou le vanadate) décrits précédemment, puis à

diluer ces vésicules dans des solutions contenant 100 μM ou 1 mM de Ca^{2+} , et enfin à mesurer l'activité ATPasique réapparaissant au cours du temps. Les résultats montrent que les complexes incubés en présence de vanadate sont réactivés relativement rapidement alors que les complexes inhibés par le béryllium fluorure, et *a fortiori* ceux inhibés par le magnésium fluorure, résistent plus longtemps à la réactivation par le Ca^{2+} , même à concentration élevée. Par interpolation entre 100 μM et 1 mM, ces expériences de réactivation montrent que la proportion d'ATPases réactivées au bout de quelques minutes en présence de 200 μM de Ca^{2+} ne s'élève pas à plus de 10 à 20 % des ATPases totales. Ceci nous conforte dans l'idée que la fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ observée Figure 9 sur des temps beaucoup plus courts, quelques dizaines de secondes, reflète bien pour l'enzyme E2BeF_x la fixation rapide de Ca^{2+} sur les sites (luminaux, voir ci-dessous) de transport, alors que le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ compté sur E2.VO_4 est dû en bonne partie au fait que ces espèces ne sont pas stables.

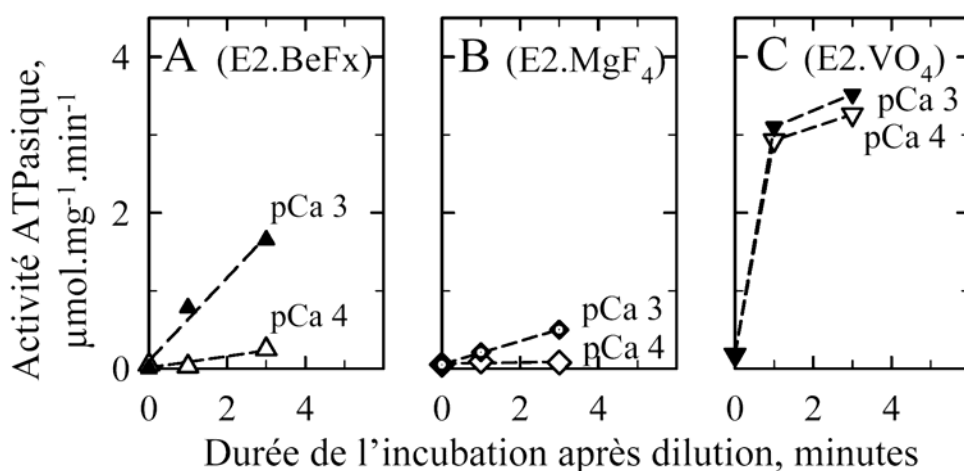


Figure 10. Restoration de l'activité ATPasique lors de la dilution de différents échantillons dans un milieu contenant 0,1 ou 1 mM de Ca^{2+} , en présence de DMSO.

Dans une série d'expériences supplémentaires, destinées à évaluer la fixation luminale de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sur les différents complexes fluorés sur des échelles de temps plus longues, et à discriminer par la même occasion entre fixation luminale et fixation cytosolique, nous avons utilisé un protocole de mesure légèrement différent. Nous avons pré-incubé des vésicules de SR (à la concentration de 3 mg/ml) pendant 1 h à 1,5 h dans le tampon de préincubation, avec ou sans les fluorures. A la fin de cette préincubation, nous avons ajouté de l'ionophore dans la moitié des échantillons. Dans un tube sur deux, nous avons aussi ajouté de la TG. Puis nous avons dilué 10 fois ces échantillons dans le même milieu de fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ que précédemment et laissé incubé pendant des temps variables. Les échantillons ont alors été déposés sur un filtre de nitrocellulose (Millipore GS), et la radioactivité comptée sans lavage du filtre, afin d'évaluer la quantité de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ effectivement liée aux protéines du SR.

En présence d'ionophore, nous retrouvons (Figure 11, panneaux A et B) les mêmes résultats (quoique ici sur des gammes de temps plus longues) que ceux présentés Figure 9A concernant l'ATPase préincubée en EGTA seul (panneau A, expérience contrôle) et l'ATPase préincubée avec en plus le fluorure de béryllium (panneau B), même si le protocole est légèrement différent. La quantité de Ca^{2+} fixée sur l'ATPase initialement dans sa forme E2 est toujours de l'ordre de 10 nmol/mg. En absence d'ionophore (Figure 11, panneaux du bas), si fixation il y a, elle ne peut en principe se faire que par l'extérieur des vésicules (cf cartoon ; voir cependant plus bas pour discussion fine). De fait, la quantité de radioactivité fixée (panneau D) est bien ce que l'on attend: une fixation spécifique sur l'ATPase initialement en

E2 (mais qui va ensuite subir la transition conformationnelle $E2 \rightarrow E1$ et fixer du Ca^{2+} du côté cytosolique) toujours égale à 10 nmol/mg environ ; et une fixation « non-spécifique », en présence de TG, beaucoup plus faible, car l'accès aux sites internes est limité (voir plus loin). Remarquons que pour ces vésicules intactes, la quantité de $^{45}Ca^{2+}$ fixé, en présence et en absence de TG tend à augmenter progressivement au cours du temps. Nous attribuons ceci au fait que le Ca^{2+} va, sur le long terme, réussir à rentrer dans les vésicules par diffusion passive, et produire de la fixation « non spécifique » sur la calséquestrine. Remarquons aussi, pour la discussion tout à l'heure, que l'extrapolation au temps zéro de cette fixation « non-spécifique » en présence de TG n'est pas nulle.

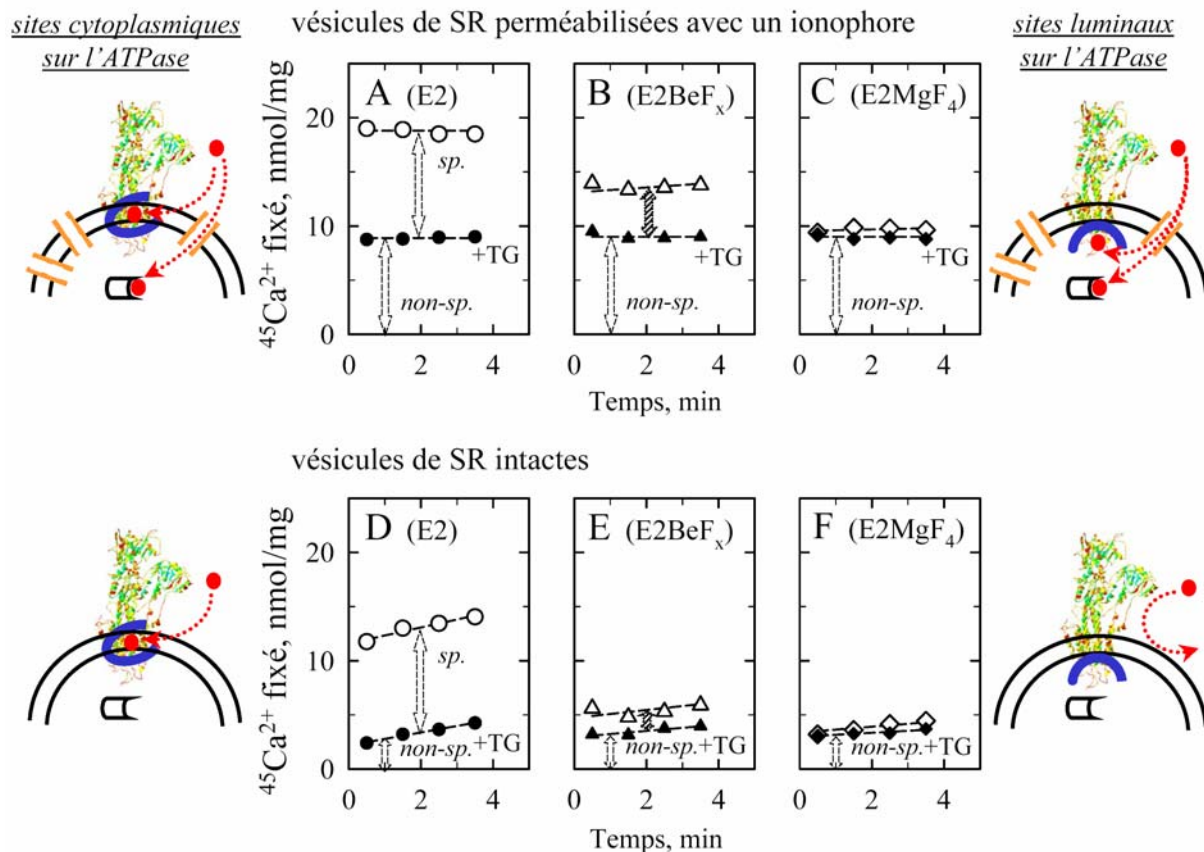


Figure 11. Mesure de la fixation de $^{45}Ca^{2+}$ sur des vésicules perméabilisées avec du A23187 (panneaux du haut) ou sur des vésicules intactes (panneaux du bas). Les vésicules ont été préalablement incubées en présence d'EGTA seul (panneaux A et D), ou bien avec en plus fluorure de béryllium (panneaux B et E) ou fluorure de magnésium (panneaux C et F)

Préincubée en présence de fluorure de béryllium, l'ATPase fixe une quantité de Ca^{2+} non négligeable lorsque les vésicules ont été perméabilisées (panneau B). Et nous pouvons maintenant affirmer que cette fixation se fait du côté luminal, parce que si l'on s'intéresse maintenant à la même ATPase à laquelle on n'a pas rajouté d'ionophore (panneau E), la quantité de $^{45}Ca^{2+}$ liée aux vésicules est significativement plus basse, à peine plus élevée que la fixation « non-spécifique ». La différence n'est pourtant pas nulle. Mais nous l'attribuons au fait que *toutes les vésicules ne sont pas étanches* : ou bien certaines de ces vésicules sont mal refermées, ou bien dans certaines il y a des ATPases dénaturées qui offrent des voies de passage au calcium (Davidson and Berman 1996). Notons que la fixation de $^{45}Ca^{2+}$ sur E2.BeF₃ augmente toujours légèrement au cours du temps, soit de nouveau à cause d'une certaine perméabilité des vésicules au Ca^{2+} , soit en plus à cause d'une déstabilisation lente du complexe fluoré. Lorsqu'on laisse incubé cette ATPase pendant des temps beaucoup plus

longs, on observe au bout d'une demi-heure un niveau de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ presque équivalent à celui de l'enzyme contrôle (Supplemental Material de l'article inséré à la fin de ce chapitre), qui reflète cette déstabilisation lente. Enfin, les expériences reportées sur les panneaux C et F montrent que l'ATPase incubée en présence de MgF_4 ne permet aucune fixation sur l'ATPase, ni du côté luminal, ni du côté cytosolique : en effet la quantité de Ca^{2+} fixé sur ce complexe est la même en présence et en absence de TG, sur des membranes intactes ou perméabilisées. Le même résultat a été obtenu pour une enzyme incubée en présence de fluoroaluminate (voir article).

Notons que la fixation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sur E2.BeF_x illustrée ci-dessus a été mesurée à 200 μM de Ca^{2+} , mais nous avons aussi réalisé des mesures à 100 μM de Ca^{2+} , ce qui nous a permis de confirmer que la plus faible quantité de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fixée sur E2.BeF_x par rapport à E2 est bien due à la faible affinité de cette fixation sur E2.BeF_x : son affinité a été évaluée à 150-200 μM dans nos conditions (pH 8, KCl 100 mM, Mg^{2+} 5mM, DMSO 20 %). Il est cependant malheureusement impossible de vérifier la saturation de ces sites en réalisant de telles expériences à des concentrations de Ca^{2+} plus élevées : en effet, ces mesures de radioactivité doivent être réalisées en prenant soin de garder un rapport signal sur bruit raisonnable; de plus, augmenter de manière trop significative la concentration de Ca^{2+} conduirait à la déstabilisation des complexes fluorés (cf ci-dessus).

Notons enfin que si ces expériences révèlent directement la fixation luminale rapide de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sur le complexe E2.BeF_x , elles montrent aussi qu'en présence de TG, cette fixation luminale sur E2.BeF_x est interdite, puisque le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fixé en présence de TG est le même quel que soit l'état initial de l'ATPase, E2, E2.BeF_x , E2.AlF_4 , ou E2.MgF_4 . Nous avons testé l'effet de deux autres inhibiteurs de la fixation de Ca^{2+} , le CPA et le BHQ: tous deux induisent le même blocage que la TG (voir article).

2.3. Conclusions

Nous avons apporté les preuves expérimentales de la fixation luminale de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ sur une enzyme préincubée en présence de fluorure de béryllium. Ces résultats démontrent ce qui avait été suggéré par (Danko et al. 2004) : l'intermédiaire E2.BeF_x est un bon analogue de la forme E2P , et le Ca^{2+} est bien susceptible de se fixer sur cette forme à partir de la lumière du réticulum. Ces résultats nous permettent aussi de démontrer que les formes E2.AlF_4 et E2.MgF_4 ont leurs sites fermés du côté luminal (ou une affinité vraiment très mauvaise pour le Ca^{2+}), ce qui avait été également suggéré (mais nous le démontrons). L'affinité avec laquelle les ions Ca^{2+} se fixent sur leurs sites luminaux de E2.BeF_x est faible, comme attendu, puisque la réorientation des sites de transport vers la lumière du réticulum doit s'accompagner d'une diminution de leur affinité. Notons enfin que nous avons apporté un soin tout particulier à travailler dans des conditions dans lesquelles les dérivés fluorés restent stables au cours du temps. A cet égard, la présence de 20 % de DMSO (dans 100 mM de KCl) s'est avérée particulièrement importante.

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer l'éventuel effet, sur l'ouverture luminale des sites de transport, des inhibiteurs qui, jusqu'ici, se sont avérés nécessaires à la stabilisation des formes d'ATPase dépourvues de Ca^{2+} . La question des éventuels artéfacts structuraux induits par la fixation de TG est une question récurrente pour l'analyse de la pertinence des structures, et les arguments expérimentaux ne permettaient pas jusque là de conclure de façon non ambiguë. Certaines expériences de la littérature ont montré, par exemple, que la TG n'avait aucun effet sur la protection de l'ATPase conférée par la fixation du vanadate ou de composés fluorés vis à vis de la protéolyse ménagée par la protéinase K (Danko et al. 2001a) ;

de plus la présence de TG n'affecte pas la superfluorescence du TNP-AMP fixé à l'ATPase en présence de fluorure de béryllium (Danko et al. 2004) : ces résultats suggèrent que la TG n'influence pas la conformation générale de l'ATPase. En revanche, il a été montré que la TG modifie l'affinité avec laquelle l'ATPase fixe l'ATP (Kijima et al. 1991), et qu'elle perturbe du côté luminal (justement !) la structure de cristaux bidimensionnels d'ATPase formés en présence de décavanadate (Young et al. 2001), en accord avec la suggestion que pourrait se former une espèce « déformée » d'ATPase (Wictome et al. 1992; Khan et al. 1995; Wictome et al. 1995). Dans notre chapitre III, nous avons également rapporté des expériences de protéolyse (Figure 4 du chapitre III) qui suggèrent fortement une rigidification par la TG de l'ATPase, même en absence de composés fluorés. Ici, nous avons mis en évidence que la fixation de la TG sur l'ATPase- Ca^{2+} dans son état E2.BeF_x induit la fermeture de l'accès luminal aux sites Ca^{2+} .

Ces sites sont justement décrits fermés ou quasi-fermés dans les structures cristallographiques de E2.AlF₄ et E2.MgF₄ (Olesen et al. 2004; Toyoshima et al. 2004). Nos résultats montrent qu'il y a deux raisons à cela : (i) seule la forme E2.BeF_x a ses sites ouverts, et (ii) de toutes façons, la TG empêche sans doute toute ouverture significative. Si l'on espérait voir un jour *ouvert* le chemin par lequel les ions Ca^{2+} sont relargués dans la lumière du réticulum, ce résultat n'incline pas à l'optimisme, parce qu'il sous-entend que d'éventuels futurs cristaux obtenus en présence d'inhibiteurs comme ceux que nous avons testés montreront toujours *fermé* l'accès luminal aux sites de transport. Si l'on espère voir cet accès ouvert dans un cristal, il faut sans doute cristalliser E2.BeF_x sans inhibiteur de ce type.

D'un point de vue général, il nous apparaît donc important de continuer à se poser la question de la pertinence, d'un point de vue fonctionnel, des structures cristallographiques. Ces structures sont indéniablement une grande aide pour la compréhension de mécanismes biologiques. Toutefois, la cristallisation de protéines, et à fortiori de protéines membranaires, n'est pas une mince affaire: la cristallisation doit permettre l'obtention de cristaux tridimensionnels de qualité suffisante pour la diffraction par les rayons X tout en satisfaisant aux exigences de stabilité sur le long terme de la protéine d'intérêt. Les conditions de cristallisation sont donc souvent éloignées des conditions que l'on utilise dans le cadre des tests fonctionnels, et encore plus éloignées des conditions physiologiques. Nous avons montré deux exemples pour lesquels les conditions de cristallisation sont susceptibles d'induire des conformations qui ne sont pas représentatives de ce qui existe en solution. Une collaboration étroite entre études fonctionnelles et études structurales est sans doute utile pour éviter de sur-interpréter d'éventuels artéfacts structuraux.

Manuscript # 3:

The average conformation at micromolar $[\text{Ca}^{2+}]$ of Ca^{2+} -ATPase with bound nucleotide *differs* from that adopted with the transition state analog ADP.AIFx or with AMPPCP under crystallization conditions at millimolar $[\text{Ca}^{2+}]$.

Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. (2005)

J. Biol. Chem. 280, 18745-18754.

The Average Conformation at Micromolar $[\text{Ca}^{2+}]$ of Ca^{2+} -ATPase with Bound Nucleotide *Differs* from That Adopted with the Transition State Analog ADP·AlF_x or with AMPPCP under Crystallization Conditions at Millimolar $[\text{Ca}^{2+}]$ *[§]

Received for publication, February 10, 2005, and in revised form, February 23, 2005
Published, JBC Papers in Press, March 9, 2005, DOI 10.1074/jbc.M501596200

Martin Picard[‡], Chikashi Toyoshima[§], and Philippe Champeil^{‡¶}

From the [‡]Unité de Recherche Associée 2096 (CNRS), Service de Biophysique des Fonctions Membranaires (Département de Biologie Joliot-Curie, CEA) and IFR-46 (Université Paris-Sud), CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France and the [§]Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

Crystalline forms of detergent-solubilized sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, obtained in the presence of either a substrate analog, AMPPCP, or a transition state complex, ADP-fluoroaluminate, were recently described to share the same general architecture despite the fact that, when studied in a test tube, these forms show different functional properties. Here, we show that the differences in the properties of the E1-AMPPCP and the E1-ADP·AlF_x membranous (or solubilized) forms are much less pronounced when these properties are examined in the presence of 10 mM Ca^{2+} (the concentration prevailing in the crystallization media) than when they are examined in the presence of the few micromolar of Ca^{2+} known to be sufficient to saturate the transport sites. This concerns various properties, including ATPase susceptibility to proteolytic cleavage by proteinase K, ATPase reactivity toward SH-directed Ellman's reagent, ATPase intrinsic fluorescence properties (here described for the E1-ADP·AlF_x complex for the first time), and also the rates of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ - $^{40}\text{Ca}^{2+}$ exchange at site "II." These results solve the above paradox at least partially and suggest that the presence of a previously unrecognized Ca^{2+} ion in the E1-AMPPCP crystals should be re-investigated. *A contrario*, they emphasize the fact that the average conformation of the E1-AMPPCP complex under usual conditions in the test tube *differs* from that found in the crystalline form. The extended conformation of nucleotide revealed by the E1-AMPPCP crystalline form might be only indicative of the requirements for further processing of the complex, toward the transition state leading to phosphorylation and Ca^{2+} occlusion.

After the initial description of the high resolution structures of two crystalline forms of the sarcoplasmic reticulum calcium pump (the membranous Ca^{2+} -dependent P-type ATPase SERCA1a) (1, 2), additional forms of this Ca^{2+} -ATPase were recently crystallized, with the hope of characterizing as many as possible of the different intermediates formed in sequence

during the catalytic cycle of this enzyme and therefore to provide a structural basis for the mechanistic description of ion pumping (3–7). Among these forms, one has its two transport sites occupied by Ca^{2+} , and its nucleotide binding site occupied by a non-hydrolyzable analog of ATP, AMPPCP¹; it is referred to as "E1-AMPPCP." Another one, referred to as "E1·AlF_x·ADP," also has its two transport sites occupied by Ca^{2+} , and it has been obtained by crystallization of the quasi-irreversible complex formed by ATPase with ADP and aluminum fluoride, a complex thought to be a fair analog of the transient species formed in the catalytic cycle immediately before the ADP-sensitive "E1P" phosphoenzyme. The overall polypeptide chain architecture was found to be very similar in these two crystalline forms (except for specific features at the catalytic site): in particular, in both forms (3–6), the M1–M2 transmembrane helices appear to be pulled up toward the cytosol and the top portion (M1') of the M1 helix gets kinked, thereby locking the conformation of Glu³⁰⁹, a residue thought to cap Ca^{2+} at one of its binding sites, "site II," and therefore to be critical for dissociation of the two bound Ca^{2+} ions out of their binding pocket (e.g. Refs. 8 and 9). This locking by M1–M1' of the conformation of Glu³⁰⁹ was considered to be responsible for the long known "occlusion" of Ca^{2+} (10) that occurs during normal turnover, after ATPase phosphorylation from ATP. In the (stable) E1·AlF_x·ADP form, it is indeed accepted that the Ca^{2+} transport sites are occluded (4, 9, 11), as in the (transient) E1P phosphoenzyme form.

However, it has been suggested previously that a similar occlusion occurs neither after the mere formation of a non-covalent E1-AMPPCP complex, nor after the mere formation of the E1·Mg·ATP complex that immediately precedes phosphorylation during the normal cycle (4, 9, 12, 13). This apparent discrepancy between the different properties of the two ATPase forms and their similar crystalline structure has already been noted (4, 5, 9), and various interpretations have been given, together with somewhat contradictory comments that these two forms, E1-AMPPCP and E1·AlF_x·ADP, have (5) or do not have (4) a similar pattern of resistance to cleavage by proteinase K of their cytosolic domains. Structural fluctuation of the

* This work was supported by the French Program Toxicologie Nucléaire Environnementale, as well as the international Human Frontier Science Program Organization (Grant RGP 0060/2001-M). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[§] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains additional text and Figs. I–XVI.

[¶] To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-1-690-83731; Fax: 33-1-690-88139; E-mail: champeil@dsvidf.cea.fr.

¹ The abbreviations used are: AMPPCP, adenosine 5'-(β,γ-methylene)triphosphate; SR, sarcoplasmic reticulum; ATPase, adenosine triphosphatase; quin2, 2-[(2-amino-5-methylphenoxy)methyl]-6-methoxy-8-aminoquinoline-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; Mes, 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid; Mops, 4-morpholinepropanesulfonic acid; DTNB, Ellman's reagent, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid); PK, proteinase K; C₁₂E₈, octaethyleneglycol monododecyl ether; DDM, dodecyl-maltoside; ATPγS, (adenosine 5'-[γ-thio]triphosphate); Tricine, *N*-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine.

non-crystallized ATPase·AMPPCP complex (we will discuss it) and/or selection of a particular conformation by crystal packing were suggested to explain the different occlusion properties of the two ATPase forms in a test tube (4, 5).

In view of the significance of this issue with respect to the mechanism of occlusion, we decided to further document the resemblance or differences between E1·AMPPCP and E1·AlFx·ADP forms. In particular, we asked whether any clues could be provided by the fact that the published crystalline forms of E1·AMPPCP had been obtained at very high Ca^{2+} concentrations. Under high millimolar Ca^{2+} conditions, we found that the ATPase complex with AMPPCP indeed has properties closer to those of the ATPase complex with ADP·fluoroaluminate than under micromolar Ca^{2+} conditions, from the point of view of various indexes, including exchange of calcium at site II (hence its dissociation from this site), resistance to proteolysis, susceptibility to SH modification, or Trp fluorescence. This was especially true when Ca^{2+} -ATPase was solubilized by detergent. For comparison, we also briefly documented the (different) influence of Mg^{2+} on the effect of AMPPCP and other nucleotides. We discuss various possibilities possibly explaining why a high Ca^{2+} could favor resemblance between the E1·AMPPCP and E1·AlFx·ADP forms. We also discuss various possibilities to explain, *a contrario*, the differences between the fluoroaluminate complex and the AMPPCP complex under more usual conditions: among these, the average conformation of the E1·AMPPCP complex under such conditions might well be different from the one found in the crystal, a fact that should not be overlooked in future descriptions of ATP binding to Ca^{2+} -ATPase during the normal cycle.

MATERIALS AND METHODS

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ dissociation from sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase or its exchange with $^{40}\text{Ca}^{2+}$ was measured with a rapid filtration Bio-Logic device (12). For these measurements, ATPase-containing SR membranes were adsorbed onto Millipore nitrocellulose (HA) filters (0.45- μm pore diameter). The SR membranes had previously been equilibrated for 5–15 min with either 25 or 50 μM $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (plus 50 μM [^3H]glucose as a volume marker), in the absence or presence of various additives. The adsorbed membranes were perfused for various periods of time, at flow rates ranging from 0.5 to 4.5 ml/s depending on the perfusion period. In addition to the above buffer, the perfusion fluid also contained either EGTA or various concentrations of unlabeled Ca^{2+} ($^{40}\text{Ca}^{2+}$), again in the absence or presence of various additives. Radioactivity in the perfused filter (or in a non-perfused filter, for time zero control) was finally counted, without rinsing. The total $^{45}\text{Ca}^{2+}$ found was corrected for the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ content in the wet volume by taking into account the ^3H radioactivity present in the same filter (this $^{45}\text{Ca}^{2+}$ or ^3H content in the wet volume was of course very small after the filter had been perfused).

Ca^{2+} dissociation from sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase was also measured in stopped-flow experiments using quin2, a fluorescent Ca^{2+} -sensitive dye whose strong complex with Ca^{2+} has a fluorescence level different from that of the Ca^{2+} -free dye (higher or lower depending on the excitation wavelength; see Refs. 14–17). We were initially concerned by the possibility that the presence of nucleotide could interfere with this measurement of quin2 fluorescence, if dissociation of a pre-formed Ca^{2+} -nucleotide complex were to superimpose with dissociation of Ca^{2+} from Ca^{2+} -ATPase. However, this does not occur, based on several facts: (i) the amplitude of the quin2 fluorescence change is essentially similar with or without AMPPCP; (ii) observed rate constants in the presence of AMPPCP are essentially similar when AMPPCP is initially present in both syringes and when AMPPCP is initially only present together with quin2 (in the latter case, the Ca·AMPPCP complex is not formed); (iii) we directly checked, in the absence of membranes, that any Ca·AMPPCP or Ca·ATP complex formed under our conditions dissociates faster than the dead time (3 ms) of our stopped-flow measurements.

All these experiments were performed at 20 °C. Most of them (unless otherwise noted) were performed in a 50 mM Mes-Tris buffer at pH 6, generally without potassium, or in a 50 mM Mops-Tris buffer at pH 7, supplemented with 100 mM KCl and 5 mM Mg^{2+} . AMPPCP and ATP γS were from Sigma, ADP was from Fluka, and quin2 was from Calbio-

chem. Equilibrium fluorescence experiments were performed with a SPEX Fluorolog fluorometer, with constant stirring of the temperature-controlled cell. Stopped-flow experiments were performed with Bio-Logic SFM3 equipment; quin2-emitted fluorescence was detected with a broad band filter, DA 531 from MTO (Massy, France).

The extent of Ca^{2+} -ATPase proteolysis by proteinase K under different conditions was examined by SDS-PAGE in 12% acrylamide gels prepared in the presence of 1 mM Ca^{2+} , as described in Ref. 18. SH reaction with DTNB (Ellman's reagent, from Sigma) was monitored at 25 °C, using a diode array spectrophotometer (HP 8453) operated in the kinetic mode. DTNB conversion to a colored anion upon reaction with SH groups was monitored at 430 nm, using an extinction coefficient of 12 $\text{mm}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, slightly lower than that at the wavelength for maximal absorption (13.6 $\text{mm}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ at 412 nm); 430 nm, instead of the more widely used wavelength of 412 nm, was chosen to minimize the slight interference with DTNB absorption which occurs at 412 nm. Absorption by DTNB is not visible in Fig. 4 because DTNB was already present in the buffer used to record the blank spectrum.

Note that, judging from the apparent affinities reported in Ref. 19 for AMPPCP-cation complexes, the dissociation constants of AMPPCP complexes with Mg^{2+} and Ca^{2+} in 50 mM Mes-Tris at pH 6 probably are in the 0.4–0.5 mM and the 0.8–1 mM ranges, respectively (*i.e.* intermediate between those for ATP and those for ADP, as also shown by our own measurements with antipyrilazo III, data not shown).

RESULTS

ADP·AlFx Blocks $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Dissociation from SR Ca^{2+} -ATPase, but under Ordinary Conditions, AMPPCP Does Not—Sørensen *et al.* (4) and Toyoshima and Mizutani (5) found that the presence of AMPPCP or ADP·fluoroaluminate in the crystalline forms of Ca^{2+} -ATPase resulted in structural changes indicative of occlusion of the bound Ca^{2+} ions in both cases, but they already noted that this was somewhat dissonant with a previous experimental finding deduced from rapid filtration experiments with $^{45}\text{Ca}^{2+}$: the half-time for the dissociation of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ from the transport sites of non-phosphorylated ATPase only increases by 50% in the presence of 250 μM AMPPCP, at pH 6 in the presence of 20 mM Mg^{2+} (12), and thus dissociation remains relatively fast in the presence of AMPPCP. We first repeated that old experiment under different conditions, and at pH 7 in the presence of 5 mM Mg^{2+} , found a similar although not identical result: AMPPCP again failed to block $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dissociation, but in these experiments did not even slow down the rate of this dissociation at all, even if its concentration was increased up to 2.5 mM. Yet, under the same conditions, preliminary incubation of Ca^{2+} -ATPase with ADP and fluoroaluminate did block $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dissociation completely (see Fig. I in the Supplemental Material, and accompanying comments).

Depending on Mg^{2+} , AMPPCP May Either Stimulate or Slightly Reduce the Rate of Overall Ca^{2+} Dissociation from Ca^{2+} -ATPase, and the Modulatory Effect of Mg^{2+} Differs for Various Nucleotides—We therefore re-investigated the effect of AMPPCP under the previous conditions at pH 6, using a stopped-flow assay in which Ca^{2+} dissociation from Ca^{2+} -ATPase was triggered by mixing Ca^{2+} -equilibrated SR vesicles with the fluorescent chelator quin2, whose fluorescence changes allowed us to monitor the rate of this Ca^{2+} dissociation (see “Materials and Methods” and Fig. II in Supplemental Material). With this new assay, we found that at pH 6 too, AMPPCP in the presence of a few millimolars of Mg^{2+} only minimally affected Ca^{2+} dissociation from ATPase (Fig. 1A), but we nevertheless confirmed that in the presence of 20 mM Mg^{2+} AMPPCP did slow down Ca^{2+} dissociation moderately, as previously observed in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ filtration experiments (12); at lower Mg^{2+} concentrations, however, this slowing down was in fact converted into a definite *acceleration* of the rate of Ca^{2+} dissociation, by a factor of up to 4 in the total absence of Mg^{2+} (representative traces are shown in Fig. III of Supplemental Material). This is summarized in *panel B* of Fig. 1, which includes experiments performed at high AMPPCP concentra-

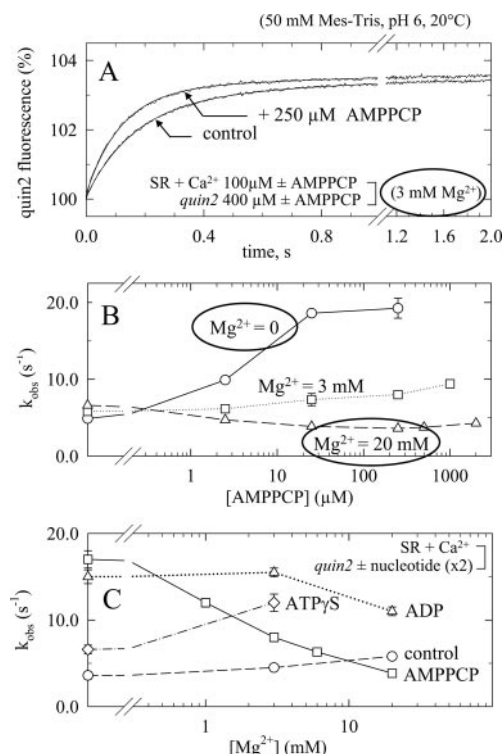


FIG. 1. AMPPCP stimulates or slightly reduces the rate of quin2-induced Ca^{2+} dissociation from Ca^{2+} -ATPase, depending on Mg^{2+} ; this modulation by Mg^{2+} differs from that for other nucleotides. The effect of AMPPCP (A and B) or other nucleotides (C) on the rate of Ca^{2+} dissociation from SR Ca^{2+} -ATPase was measured at various concentrations of Mg^{2+} . The buffer also contained 50 mM Mes-Tris (pH 6 and 20 °C). A and B, sarcoplasmic reticulum membranes (SR, 0.4 mg/ml) were preincubated with calcium (100 μM) in the absence or presence (as indicated on each trace) of 250 μM AMPPCP. This suspension was mixed in a one-to-one volume in a stopped-flow device with quin2 (400 μM), again in the absence or presence of AMPPCP. Quin2 fluorescence (excited at 312 nm), whose rise reflects Ca^{2+} dissociation from the ATPase, has been normalized to its initial fluorescence level immediately after mixing. Monoexponential fits (to $y = y_0 + a(1 - e^{-bx}) + cx$) and experimental data points are superimposed. The experiment illustrated in A was performed at 3 mM Mg^{2+} , in the absence or presence of 250 μM AMPPCP. Similar measurements were performed at various AMPPCP and Mg^{2+} concentrations (some of them are shown in Fig. III of Supplemental Material), and measured rate constants are plotted in B. For C, similar experiments were performed in the absence (circles) or presence of various nucleotides, now added together with quin2 at twice their final concentration after mixing: AMPPCP again (squares) (results were similar to those with the other protocol), ATP γ S (diamonds), or ADP (triangles) (final concentrations were 250 μM , 250 μM , and 1 mM, respectively). Note that in a control experiment, 250 μM AMPPCP alone was preincubated with 100 μM Ca^{2+} (in the absence of SR vesicles or Mg^{2+}) and then mixed one-to-one with quin2; under these conditions, the fluorescence trace remained flat, implying that Ca^{2+} bound to the nucleotide dissociates within the mixing time of the experiment.

tions in the presence of 20 mM Mg^{2+} . These data reveal no real occlusion of Ca^{2+} after the mere binding of AMPPCP.

In the absence of Mg^{2+} , the EC_{50} for AMPPCP-induced acceleration of Ca^{2+} dissociation was in the micromolar range (open circles in panel B; the true EC_{50} is somewhat lower than the one apparent in this panel, because of sub-stoichiometric conditions for the lowest concentration of AMPPCP tested). Incidentally, note that, although the quin2 fluorescence rise that we measured monitors the overall dissociation of the two Ca^{2+} ions previously bound to Ca^{2+} -ATPase (see "Materials and Methods" and Fig. II in Supplemental Material), all traces were quasi-monophasic, as previously noted and interpreted within the context of a "flickering gate" for the Ca^{2+} binding pocket (12, 17, 20).

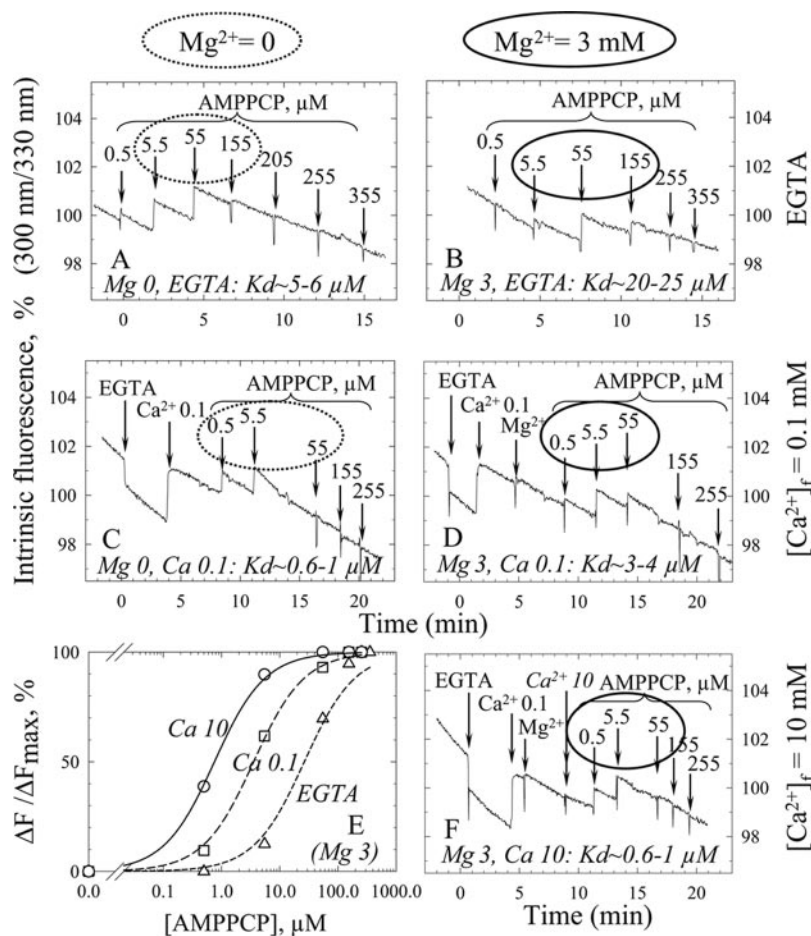
AMPPCP is not a perfect analog of ATP, because the Mg^{2+} dependence of its binding to Ca^{2+} -ATPase is opposite to the

Mg^{2+} dependence of the binding of ATP itself (19, 21, 22; this will be confirmed below), presumably because binding in the presence of Mg^{2+} is perturbed by the CH_2 link between β and γ phosphates in AMPPCP. Therefore, for comparison, we also measured the rate of Ca^{2+} dissociation from ATPase in the presence of another poorly-hydrolyzable analog of ATP, ATP γ S, whose Mg^{2+} dependence has been shown to retain an ATP-like behavior, *i.e.* a higher affinity in the presence of Mg^{2+} than in its absence (23). ATP γ S was found to stimulate the rate of Ca^{2+} dissociation both in the absence and presence of Mg^{2+} , and in this case Mg^{2+} enhanced the ATP γ S-dependent acceleration instead of converting it into a slowing down (original traces in Fig. IV of Supplemental Material). Note that, for these experiments, ATP γ S (at twice the final concentration) was purposely added together with quin2, and thus, SR vesicles were *not* preincubated with ATP γ S: this is because ATP γ S, although poorly hydrolyzed (24), has been shown to react with Ca^{2+} -ATPase in the presence of Ca^{2+} , leading to accumulation of a thio-phosphorylated intermediate (25). This alteration in our experimental protocol (compared with the above-described case of AMPPCP) was tested in the case of AMPPCP, and it had no significant influence on the rate constant for Ca^{2+} dissociation; note that nucleotide-dependent rates of Ca^{2+} binding have previously also been found similar when the nucleotide is added simultaneously with Ca^{2+} and when nucleotide is preincubated with Ca^{2+} -free ATPase (26), presumably because of the fairly fast rate of nucleotide binding at a concentration of 250 μM . Because of the puzzling difference between AMPPCP and ATP γ S in their Mg^{2+} dependences, we performed a third series of experiments with ADP (again added together with quin2) in the presence of various concentrations of Mg^{2+} . 1 mM ADP accelerated Ca^{2+} dissociation at all concentrations of Mg^{2+} . Fig. 1C summarizes all these results.

Note that experiments were also performed at pH 6 in the presence of 100 mM KCl and 5 mM Mg^{2+} . In this series of experiments, 250 μM AMPPCP again hardly affected the rate of Ca^{2+} dissociation (from 14 to 15 s^{-1}), whereas the same concentration of ADP accelerated it moderately (to 23 s^{-1}) (data not shown). In previous experiments performed at pH 6.5 in the presence of 100 mM KCl and 2 mM Mg^{2+} at 11 °C, ADP had also been found to only have a weak effect on Ca^{2+} dissociation (15). This confirms that, although the presence of potassium slightly accelerates Ca^{2+} dissociation (*e.g.* Refs. 12 and 17), it does not affect the above-described pattern of nucleotide-induced alteration: the presence of nucleotide generally does not lead to Ca^{2+} occlusion.

If Free Ca^{2+} Is Increased to High Millimolar Concentrations, Well Beyond Those Allowing Saturation of the ATPase High Affinity Sites, AMPPCP Binds to Ca^{2+} -ATPase with Even Higher Affinity—As a preliminary step in our attempt to understand the effect of AMPPCP on Ca^{2+} -ATPase under crystallization conditions, we estimated the affinity with which AMPPCP binds to Ca^{2+} -ATPase under such conditions, namely in the presence of a high millimolar Ca^{2+} concentration. For this purpose, we used a Trp fluorescence assay (27), and first checked that it gave results consistent with the above-mentioned effect of Mg^{2+} on AMPPCP binding (19, 21, 22). That this was the case, both in the absence and in the presence of an ordinary submillimolar concentration of Ca^{2+} , is shown in panels A–D of Fig. 2 (for control, the well known opposite dependence on Mg^{2+} of ATP binding in the absence of Ca^{2+} is shown in Fig. V of Supplemental Material); note that the equilibrium dissociation constant for AMPPCP binding deduced from the assay in the presence of Ca^{2+} and absence of Mg^{2+} (Fig. 2C) is slightly lower than the apparent EC_{50} with which AMPPCP accelerates the rate of Ca^{2+} dissociation from its binding sites in the absence of Mg^{2+} (previously illustrated in Fig. 1B): this

FIG. 2. Effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} on AMPPCP binding to ATPase: Mg^{2+} reduces the ATPase affinity for AMPPCP, whereas a high millimolar Ca^{2+} increases it. SR membranes (here at 0.08 mg/ml) were suspended in a medium containing 50 mM Mes-Tris (pH 6 and 20 °C). A and B, EGTA (0.5 mM) was first added, followed for B by 3 mM Mg^{2+} (not shown); then, AMPPCP was sequentially added, at the final total concentrations indicated (in μM). This involved only minimal dilution (typically 2 μl of concentrated ligand into 2 ml), and these small dilution-induced artifacts have been corrected for. C and D, EGTA (0.5 mM) was again added first; this was followed by addition of Ca^{2+} (0.6 mM total concentration, hence 0.1 mM free Ca^{2+}) and for D, Mg^{2+} ; then AMPPCP was again sequentially added, at the final total concentrations indicated (in μM). F, same as for D but with an extra addition of 10 mM Ca^{2+} (double arrow) before AMPPCP. Here, fluorescence emission at 330 nm was recorded with excitation at 300 nm (respective spectral bandwidths were 10 and 5 nm) to minimize inner filter effects due to the highest nucleotide concentrations. The equilibrium dissociation constant for nucleotide estimated from each curve has been indicated on the corresponding Panel; E shows the plots corresponding to experiments performed in the presence of 3 mM Mg^{2+} .



is probably in part due to the fact that nucleotide binding at a concentration of only a few micromolar may be rate-limiting.

We then monitored the binding of various concentrations of AMPPCP in the presence of a high, millimolar Ca^{2+} concentration, and found that the affinity for AMPPCP binding was increased further, compared with its affinity in the presence of submillimolar Ca^{2+} concentrations sufficient to saturate the Ca^{2+} transport sites: this was found both in the presence of Mg^{2+} (Fig. 2, E and F) and in its absence (Fig. VI of Supplemental Material). Related results are scattered in the literature (19, 21, 22). A high millimolar Ca^{2+} therefore affects AMPPCP binding in some way.

AMPPCP Binding at Millimolar Ca^{2+} (but Not Submillimolar Ca^{2+}) Almost Fully Protects ATPase from Proteolysis by Proteinase K—We first estimated the effect of a high millimolar Ca^{2+} on AMPPCP-dependent changes through measurements of the susceptibility of Ca^{2+} -ATPase to proteolysis. The simultaneous presence of AMPPCP and Ca^{2+} (18, 28, 29) was previously described as affording partial protection of Ca^{2+} -ATPase from digestion by proteinase K, and the combination of fluoroaluminate with ADP in the presence of Ca^{2+} was also described previously to afford protection (9, 28). In one of the analyses of the x-ray data, the increased resistance of both the E1·AMPPCP and E1·AlFx·ADP forms against proteolysis was considered to be consistent with the similar structures of the two crystalline forms (5). In contrast, in another analysis (4), the protection afforded by AMPPCP was reported to be only minimal compared with the strong protection afforded by fluoroaluminate in the presence of ADP and Ca^{2+} , and this was considered instead to be consistent with the lack of Ca^{2+} occlusion by E1·AMPPCP, despite the similar structures (4). In the present work, we have tried to solve these apparent discrepan-

cies by giving particular attention to the Ca^{2+} concentration prevailing during proteolysis.

We have found that extensive protection by AMPPCP is obtained in the presence of millimolar Ca^{2+} concentrations similar to those used for crystallization. This is shown in Fig. 3, a quasi-repetition of Fig. S2 in Sørensen *et al.* (4), except that in addition to monitoring ATPase proteolysis in the presence or absence of AMPPCP, in the presence of 0.1 mM Ca^{2+} (and the presence of 1 mM Mg^{2+} , at pH 6.5, panel A), we repeated the experiment in the presence of 10 mM Ca^{2+} (panel B): the combination of AMPPCP and a high Ca^{2+} concentration provided almost full protection against proteolysis, in contrast with the only poor protection observed at 0.1 mM Ca^{2+} . Similar results were also obtained at pH 7.2, as in Sørensen *et al.*'s experiments (see Fig. VII in Supplemental Material). Thus, at high Ca^{2+} , AMPPCP does exert effects similar to those exerted by ADP·fluoroaluminate.

A Millimolar Ca^{2+} Concentration Also Makes AMPPCP More Efficient for Protecting the ATPase Sulphydryl Groups from Modification by DTNB—Measuring the susceptibility of ATPase cysteines to modification by DTNB (Ellman's reagent) was reported to be another way of differentiating the E1·AMPPCP and E1·AlFx·ADP forms, because the susceptibility of the former was almost unaltered compared with control, whereas that of the latter was drastically reduced (4). We repeated this experiment, using alkaline conditions classically used to deprotonate sulphydryl groups and therefore render them reactive to DTNB; reaction of SH groups with DTNB could be reliably deduced from the development of an absorption band characteristic of the appearance of 2-nitro-5-thiobenzoate (e.g. Fig. 4, A and B), with essentially no complication arising from turbidity problems (as checked at

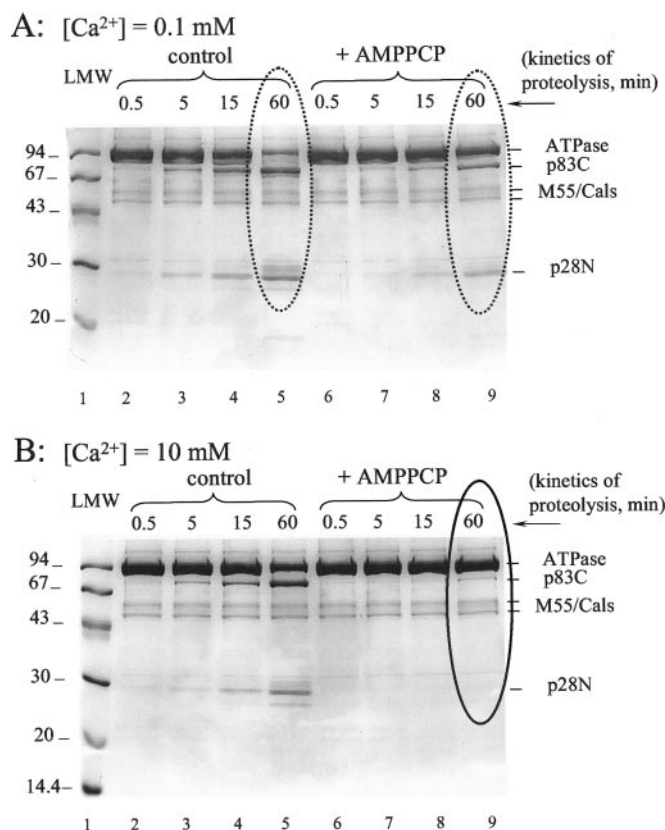


FIG. 3. AMPPCP binding at millimolar Ca²⁺ (but not submillimolar Ca²⁺) almost fully protects ATPase from proteolysis by proteinase K. SR Ca²⁺-ATPase (2 mg/ml) was treated for various periods with Proteinase K (0.03 mg/ml) at 20 °C in proteolysis buffer containing 100 mM Mes-Tris (pH 6.5), 100 mM NaCl, 1 mM Mg²⁺, and either 0.1 mM Ca²⁺ (A) or 10 mM Ca²⁺ (B), in the absence (lanes 2–5) or presence (lanes 6–9) of 0.5 mM AMPPCP, and the resulting fragments were separated by SDS-PAGE on a Laemmli gel and stained with Coomassie Blue. Lanes 1 show molecular mass standards (Amersham Biosciences).

higher wavelengths, e.g. 550 nm, see Panel D). As in Ref. 4, we found that one or two SH group(s) per ATPase remained very reactive to DTNB in all cases, but beyond these very reactive groups, we again found that the combination of AMPPCP with a high millimolar Ca²⁺ concentration was more efficient for reducing the susceptibility of the remaining SH groups than the combination of AMPPCP with a submillimolar Ca²⁺ concentration (Panel C in Fig. 4). The combination of AMPPCP and a high millimolar Ca²⁺ reduced SH susceptibility (although again not to zero) also at pH 7.5 (Fig. VIII in Supplemental Material) as well as at pH 7.2 (data not shown), instead of pH 8. In those cases, however, aggregation soon followed the reaction of SH groups with DTNB in the presence of 10 mM Ca²⁺, thus the effect was less clear (at least when SR vesicles were used, not purified ATPase as in Ref. 4); however, in that case, the presence of AMPPCP delayed aggregation very significantly, which provides additional evidence that AMPPCP in the presence of 10 mM Ca²⁺ exerted significant protection on SH groups critical for aggregation (Fig. VIII, B and D). SH groups reactivity was also reduced, although again not to zero, in the presence of ADP·fluoroaluminate (Fig. IX in Supplemental Material).

AMPPCP Slows Down ⁴⁵Ca²⁺·⁴⁰Ca²⁺ Exchange Considerably at Very High [⁴⁰Ca²⁺], to a Larger Extent Than a Similar Concentration of Mg²⁺—Thus, Figs. 3 and 4 suggest that AMPPCP in the presence of a high millimolar Ca²⁺ concentration exerts effects on Ca²⁺-ATPase that are different from (or more pronounced than) those exerted at micromolar Ca²⁺ concentra-

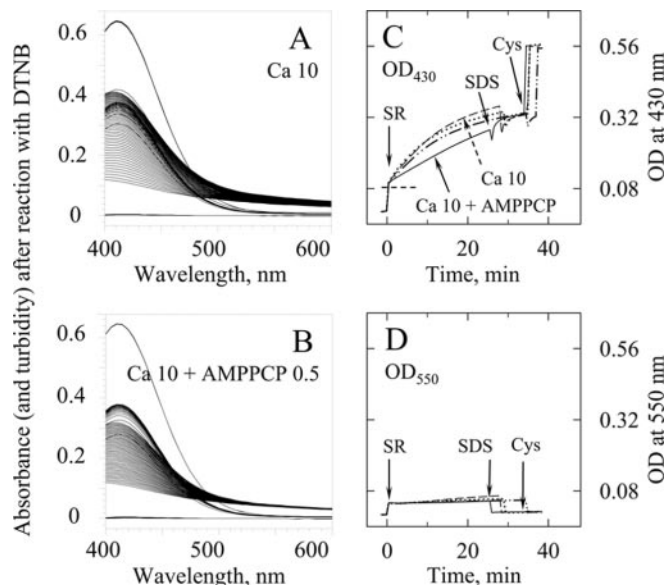


FIG. 4. A millimolar Ca²⁺ concentration, together with AMPPCP, slows down reaction of DTNB with Ca²⁺-ATPase SH groups significantly. SR vesicles (0.15 mg of protein/ml, i.e. ~1 μM ATPase) were added to a medium (25 °C) containing 0.5 mM DTNB, 100 mM Tricine-Tris (pH 8), 100 mM NaCl, 1 mM Mg²⁺, and either 0.05 mM Ca²⁺ or 10 mM Ca²⁺, in the absence or presence of 0.5 mM AMPPCP. Reaction with DTNB was monitored by taking full spectra every 30 s, as shown in A and B for the experiments performed at 10 mM Ca²⁺ without (A) or with (B) AMPPCP. After 25–30 min, 1 mg/ml SDS was added (resulting in SR vesicle solubilization), to allow more slowly reacting SH groups to nevertheless react with DTNB, and lastly L-cysteine was added (20 μM), for internal calibration. In C and D, we plotted optical densities at 430 and 550 nm, respectively, for all four experiments; the former wavelength is intended to reveal SH reaction with DTNB, whereas the latter wavelength will reveal simple turbidity changes (which remain minimal under these conditions). Conditions for the various traces in C and D were 10 mM Ca²⁺ plus AMPPCP (continuous lines); 10 mM Ca²⁺ only (dashed lines); 0.05 mM Ca²⁺ plus AMPPCP (dash-dot-dot lines); 0.05 mM Ca²⁺ only (dotted lines). On the Y scale on the right of C, the tick spacing (ΔA₄₃₀ = 0.24) corresponds to reaction with DTNB of about 20 SH groups per ATPase, the number of ATPase groups expected to be reactive to DTNB. In C, the horizontal dashed line represents the A₄₃₀ (~0.08) that should be observed, because of turbidity alone, immediately after SR vesicles addition: this dashed line makes it clear that in all cases one or two SH groups react with DTNB very rapidly.

tions. To study whether the simultaneous presence of AMPPCP and a very high Ca²⁺ concentration results in a significant slowing down of the flickering movements of the gate capping the more “superficial” Ca²⁺ binding site, occlusion implies complete freezing of these movements, we resorted to ⁴⁵Ca²⁺ filtration experiments, specifically to ⁴⁵Ca²⁺·⁴⁰Ca²⁺ exchange experiments, in which ⁴⁵Ca²⁺ ions initially bound to the transport sites are allowed to exchange with ⁴⁰Ca²⁺ in the perfusion medium. Under these conditions, it is known that only one ⁴⁵Ca²⁺ ion, the one bound to the more accessible site (site “II,” gated by Glu³⁰⁹), is freely exchangeable, whereas dissociation of the Ca²⁺ ion bound to the second site (site “I”) is greatly retarded by the ⁴⁰Ca²⁺ ion just bound (e.g. Refs. 12 and 30).

As a starting point, we knew that in the absence of AMPPCP the concentration of ⁴⁰Ca²⁺ in the perfusion medium could be raised up to 30 mM without affecting the rate of this ⁴⁵Ca²⁺·⁴⁰Ca²⁺ exchange (e.g. Fig. 6 in Ref. 12). We also knew that at pH 6 in the presence of 20 mM Mg²⁺, ⁴⁵Ca²⁺·⁴⁰Ca²⁺ exchange at 1 mM ⁴⁰Ca²⁺ was only slowed down by AMPPCP to a moderate extent, similar to that for overall ⁴⁵Ca²⁺ dissociation in the presence of EGTA (Table I in Ref. 12). The critical test, thus, was to perform a similar experiment with AMPPCP together with a still higher ⁴⁰Ca²⁺ concentration. This was first

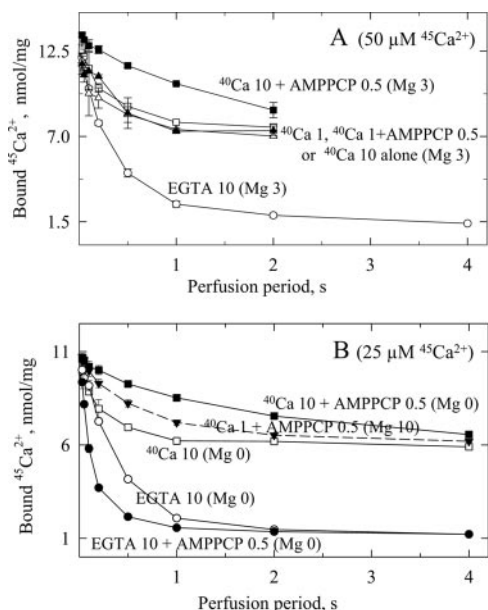


FIG. 5. The simultaneous presence of AMPPCP and a high millimolar $^{45}\text{Ca}^{2+}$ concentration does slow down $^{45}\text{Ca}^{2+}$ - $^{40}\text{Ca}^{2+}$ exchange considerably, to a larger extent than the same concentration of Mg^{2+} together with only 1 mM $^{40}\text{Ca}^{2+}$. For these measurements, 1 ml of ATPase-containing SR membrane suspension (0.25 mg of SR protein/ml) was loaded onto a Millipore nitrocellulose (HA) filter (0.45- μm pore diameter). The buffer consisted 50 mM Mes-Tris at pH 6 and 20 °C, supplemented with 3 mM Mg^{2+} . The SR membranes had been previously equilibrated for 5–15 min with 50 μM (A) or 25 μM (B) $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (plus 50 μM [^3H]glucose as a volume marker). A, the adsorbed membranes were perfused for various periods of time with Mg^{2+} -containing buffer supplemented with 10 mM EGTA (open circles), 1 mM $^{40}\text{Ca}^{2+}$ (open triangles), 10 mM $^{40}\text{Ca}^{2+}$ (open squares), 1 mM $^{40}\text{Ca}^{2+}$ and 0.25 mM AMPPCP (closed triangles), or 10 mM $^{40}\text{Ca}^{2+}$ and 0.25 mM AMPPCP (closed squares). B, the adsorbed membranes were then perfused for various periods of time with Mg^{2+} -free buffer supplemented with either 10 mM EGTA (open circles), 10 mM EGTA plus 0.5 mM AMPPCP (closed circles), 10 mM $^{40}\text{Ca}^{2+}$ (open squares), 10 mM $^{40}\text{Ca}^{2+}$ plus 0.5 mM AMPPCP (closed squares), or 1 mM $^{40}\text{Ca}^{2+}$ plus 10 mM Mg^{2+} and 0.5 mM AMPPCP (closed inverted triangles). Data points are the mean of triplicate experiments. The slightly lower initial binding in B compared with A is due to the fact that, at pH 6 in the presence of 3 mM Mg^{2+} , the ATPase affinity for $^{45}\text{Ca}^{2+}$ is such that 25 μM $^{45}\text{Ca}^{2+}$ is not fully saturating. The actual $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding levels at time zero, i.e. before any perfusion, were higher by 1–2 nmol/mg (not shown) than those shown here after the shortest perfusion period (0.03 s), because $^{45}\text{Ca}^{2+}$ also binds to nonspecific sites (e.g. negatively charged lipids) with very fast dissociation rates. The residual amount of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ after 4-s perfusion is due to $^{45}\text{Ca}^{2+}$ having slowly equilibrated passively in the lumen of the vesicles, as previously discussed (12).

done in the presence of 3 mM Mg^{2+} : Fig. 5A shows that in the presence of 10 mM $^{40}\text{Ca}^{2+}$ (a concentration that *per se* did not slow down $^{45}\text{Ca}^{2+}$ - $^{40}\text{Ca}^{2+}$ exchange), but not in the presence of only 1 mM $^{40}\text{Ca}^{2+}$, the additional presence of AMPPCP in the perfusion medium slowed down exchange considerably, i.e. the previously bound $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ions were now “quasi-occluded” in the presence of AMPPCP. This was also the case in the presence of 20 mM $^{40}\text{Ca}^{2+}$ (see Fig. X in Supplemental Material). In the absence of Mg^{2+} , where AMPPCP in the absence of $^{40}\text{Ca}^{2+}$ stimulated $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dissociation (as also shown in Fig. 1B above), AMPPCP in the presence of 10 mM $^{40}\text{Ca}^{2+}$ again slowed down $^{45}\text{Ca}^{2+}$ - $^{40}\text{Ca}^{2+}$ exchange, and 10 mM $^{40}\text{Ca}^{2+}$ was more effective than 10 mM Mg^{2+} together with 1 mM $^{40}\text{Ca}^{2+}$ (Fig. 5B). Thus, AMPPCP in the presence of the high Ca^{2+} concentrations used to obtain the crystalline form of E1·AMPPCP induced a significant slowing down of the flickering movements of the gate capping the more superficial Ca^{2+} binding site, a slowing down resembling what ADP-fluoroaluminate also does to fully occlude Ca^{2+} ions. It is, however, fair to recognize that, even at high $^{40}\text{Ca}^{2+}$ concen-

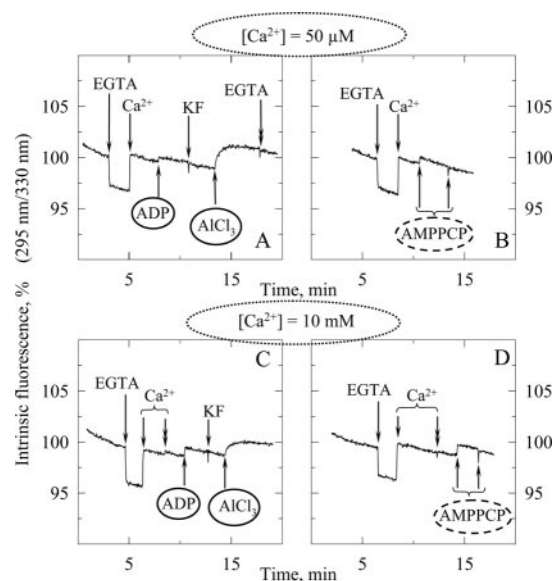


FIG. 6. In the presence of 50 μM Ca^{2+} , ADP/AlF₄ raises the ATPase intrinsic fluorescence to a level higher than that of E1·AMPPCP, but the difference is less prominent in the presence of 10 mM Ca^{2+} . SR vesicles (0.1 mg/ml) were suspended in a medium containing 100 mM KCl, 50 mM Mops-Tris, and 5 mM Mg^{2+} at pH 7 and 20 °C, and intrinsic fluorescence was examined with excitation and emission wavelengths of 295 and 330 nm, respectively (respective spectral bandwidths were 2 and 10 nm). Initial addition to the cuvette of EGTA first (240 μM , to chelate contaminating and/or endogenous Ca^{2+} , a few micromolar total) and then excess Ca^{2+} (285 μM , to reach a free $[\text{Ca}^{2+}]$ of about 50 μM and thus obtain the “Ca₂E1” form) served as an “internal calibration” of the fluorescence changes. Then, various ligands were added: either ADP (100 μM), KF (1 mM), AlCl₃ (50 μM), and then EGTA again (2 mM) (A), or AMPPCP (100 μM) followed by another identical addition of AMPPCP to check for saturation (B). C and D, the Ca^{2+} concentration in the cuvette was first brought up to 10 mM (double arrow), before addition of the same ligands as in A and B, respectively. The small dilution-induced artifacts have been corrected for.

trations, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ retention in the presence of AMPPCP did not persist for very long periods (e.g. minutes), in contrast with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ occlusion in the E1·ADP·AlF₄ complex (4).

In the Presence of 50 μM Ca^{2+} , ADP·AlF₄ Raises the ATPase Intrinsic Fluorescence to a Level Higher Than That of E1·AMPPCP (in Contrast with AMPPCP, This Involves Trp Residues Sensitive to Quenching by A23187), but in the Presence of 10 mM Ca^{2+} the Difference Is Less Prominent—We also compared the intrinsic Trp fluorescence of the E1·AlF₄·ADP and E1·AMPPCP forms. To start with, we reproduced the Trp fluorescence observations of Troullier *et al.* (Fig. 1 of Ref. 11) with SR Ca^{2+} -ATPase incubated with fluoroaluminate in the absence of Ca^{2+} : under our experimental conditions (100 mM KCl, 50 mM Mops-Tris, 5 mM Mg^{2+} , pH 7, 20 °C, with 1 mM KF, and 50 μM AlCl₃, here in the presence of 240 μM EGTA), ATPase inhibition by fluoroaluminate in the absence of Ca^{2+} was only accompanied by an initial hardly resolvable increase in fluorescence followed by slow reduction of fluorescence (as in Troullier’s paper) (Fig. XI in Supplemental Material).

In contrast, when the ATPase reaction with fluoroaluminate proceeded in the presence of 50 μM free Ca^{2+} and 100 μM ADP, instead of EGTA alone, the Trp fluorescence of Ca^{2+} -ATPase now rose significantly (Fig. 6A). The amplitude of this rise was of a few percent, like most other changes for Ca^{2+} -ATPase, and its time course was consistent with the fast inhibition that we measured in parallel in ordinary assays of the residual ATPase activity (data not shown). KF alone had no effect. After reaction with ADP-fluoroaluminate, the Trp fluorescence level was no longer sensitive to addition of excess EGTA (2 mM; double

arrow in panel A), in agreement with the previously mentioned formation of a stable ATPase complex from which occluded Ca^{2+} cannot dissociate (and Fig. I of Supplemental Material). The rate of the Trp fluorescence rise after addition of AlCl_3 in the presence of ADP and fluoride was dependent on the presence of Mg^{2+} , with an apparent affinity of a few millimolar (data not shown), and this is probably why it was not detected in Troullier *et al.*'s previous experiments, performed in the presence of 1 mM Mg^{2+} only.

Thus, it appears that formation of a complex with ADP-fluoroaluminate in the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} brings the Ca^{2+} -saturated ATPase fluorescence to a level higher than that of the "Ca₂-E1" form, and even higher than that of the "E1·ADP" form present after addition of ADP but before addition of aluminum. On the other hand, AMPPCP alone brings the Ca^{2+} -saturated ATPase up to a level only slightly higher than that produced by ADP (Fig. 6B). Thus, it is clear that under submillimolar Ca^{2+} conditions, the fluorescence level of the E1·AlFx·ADP form is different from that of the E1·AMPPCP form.

Yet, panels C and D in Fig. 6 indicate that in the presence of 10 mM Ca^{2+} , the difference between the fluorescence levels for these two forms is smaller: the fluorescence rise due to AMPPCP binding was larger (compare D to B), whereas that due to formation of the E1·AlFx·ADP complex did not change much or was even reduced, as the ADP-induced rise was also larger but the AlCl_3 -induced rise was smaller (compare C to A). Although signals were not very large, this trend was highly reproducible from one experiment to the other (see also below).

We attempted to classify the ATPase Trp residues involved in these fluorescence responses according to their sensitivity to short-range fluorescence quenchers located within the membrane, either ionophore A23187 (calcimycin), which quenches nearby Trp fluorophores through Förster resonance transfer (31), or ionophore BrA23187, which in addition to a less efficient Förster transfer mechanism probably also quenches them by a bromine-mediated quenching mechanism (*e.g.* Refs. 32 and 33). In both cases, Trp⁵⁵², the only Trp residue of Ca^{2+} -ATPase located in the cytosolic domain, is likely not to be quenched. When measurements similar to those shown in Fig. 6 (A and B) were repeated in the presence of 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ A23187 (such an amount reduced overall ATPase fluorescence to only 30% of its initial fluorescence, corresponding roughly, assuming equal contributions of the various Trp residues, to the fluorescence of 4 out of the 13 Trp residues), the initial changes observed upon addition of EGTA and then Ca^{2+} , plotted on the same vertical scale as previously (see Fig. XII of Supplemental Material), were much smaller (compare panels C and D in Fig. XII to panels A and B). This was previously found and interpreted as implying that these changes mainly arise from Trp residues located within or close to the membrane (and thus easily quenched by A23187) (31, 33). In contrast, the rise in fluorescence induced by either AMPPCP (panel D) or ADP (panel C) in the presence of Ca^{2+} was not quenched, suggesting that perhaps it mainly arose from Trp⁵⁵² in domain N; but conversely, most of the rise in fluorescence subsequently induced by AlCl_3 after addition of fluoride was quenched (panel C in Fig. XII), suggesting it mainly arose from Trp residues in the membrane domain. All this suggests that the specific rise in fluorescence accompanying formation of the E1·AlFx·ADP species in the cuvette involves Trp residues different from those involved in response to formation of the E1·AMPPCP form, presumably Trp residues within or close to the membrane domain. Judging from available structures, Trp⁵⁰, Trp⁷⁷, and Trp¹⁰⁷ in M1 and M2 move quite significantly when going from the E1·Ca₂ form to the E1·ADP·AlFx crystalline form (PDB references 1WPE

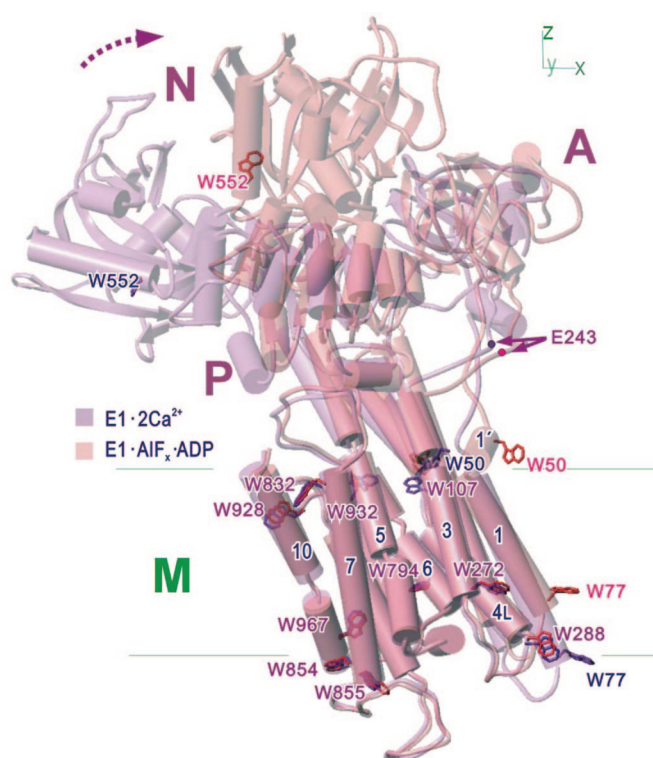


FIG. 7. Trp residues in E1 (blue) and E1·AlFx·ADP (red), superimposed with the two ribbon structures (blue and red, respectively). The ribbon structure of E1 (1SU4) is colored bluish, and that of E1·AlFx·ADP (1WPE) is colored reddish. The different Trp residues are indicated (blue (E1), red (E1·AlFx·ADP), or violet (both at the same positions) labels), located at positions 50 (top of M1 or M1'), 77 (bottom of M1), 107 (top of M2), 272 (bottom of M3), 288 (bottom of M4), 794 (M6), 832 (top of M7), 854 and 855 (bottom of M7), 928 and 932 (top of M9), and 967 (bottom of M10). 1WPE and 1SU4 have been superimposed by fitting the transmembrane domains. This figure emphasizes that, as a result of the upward movement of M1 and the bending of the top amphipathic part (M1') of M1 when going from 1SU4 to 1WPE, Trp⁷⁷ at the bottom of M1 moves upwards, leaving the membrane border and entering the hydrophobic region of the membrane; Trp⁷⁷ therefore is a likely candidate for being responsible for a higher fluorescence; Trp¹⁰⁷ at the top of M2 also slightly shifts upwards (thus possibly going from the membrane border to a more hydrophilic environment), while Trp⁵⁰ in M1 (previously buried within the transmembrane helices) has a much more exposed position (presumably at the phospholipid interface), but in these two cases rearrangement of lipids might cancel in part the expected drop in fluorescence. The other Trp residues in the membrane only change position to a much lower extent. This figure was prepared with TurboFRODO.

versus 1SU4; Fig. 7), because of movement toward the cytosol of the M1–M2 transmembrane hairpin. Because Trp⁵⁰ and Trp¹⁰⁷ seem to remain close to the membrane interface in both of these forms, Trp⁷⁷, by entering the hydrophobic region of the membrane because of this movement, could be specifically responsible for the observed rise in fluorescence.

In the Presence of Solubilizing Detergent in Addition to 10 mM Ca^{2+} , the Difference between E1·AMPPCP and the E1·ADP·AlFx Forms Is Even Less Prominent—We finally asked whether the effect of 10 mM Ca^{2+} on E1·AMPPCP would resist SR membrane solubilization by detergent, a step involved in the crystallization procedure. This was first checked using Trp fluorescence as conformational index. Fig. 8 illustrates an experiment similar to the one in Fig. 6, but now performed in the presence of 2.5 mg/ml dodecylmaltoside ("DDM," about 5 mM), a concentration in large excess over that of SR vesicles (0.1 mg/ml) and over the detergent critical micellar concentration (0.18 mM) and therefore able to solubilize these vesicles completely. Qualitatively, effects of 10 mM Ca^{2+} were similar to

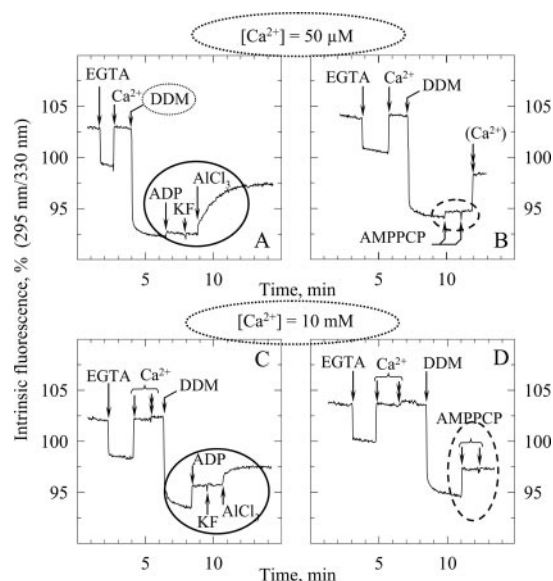


FIG. 8. In the presence of a solubilizing concentration of detergent (here DDM at 2.5 mg/ml), the effect of 10 mM Ca^{2+} on ADP·AlFx- and AMPPCP-induced changes is even more prominent. Experiment similar to that in Fig. 6, except that 2.5 mg/ml dodecylmaltoside (DDM) was added to the cuvette after the initial calibration of the Trp fluorescence signal with EGTA and Ca^{2+} . SR vesicles (0.1 mg/ml) were suspended in a medium containing 100 mM KCl, 50 mM Mops-Tris, and 5 mM Mg^{2+} at pH 7 and 20 °C, and intrinsic fluorescence was examined with excitation and emission wavelengths of 295 and 330 nm, respectively (respective spectral bandwidths were 2 and 10 nm). Initial addition to the cuvette of EGTA first (240 μM , to chelate contaminating and/or endogenous Ca^{2+} , a few micromolar total) and then excess Ca^{2+} (285 μM , to reach a free $[\text{Ca}^{2+}]$ of about 50 μM and thus obtain the “ $\text{Ca}_2\text{E1}$ ” form) served as an “internal calibration” of the fluorescence changes. Then, various ligands were added: either DDM (2.5 mg/ml), ADP (100 μM), KF (1 mM), and AlCl_3 (50 μM) (A), or DDM (2.5 mg/ml) and AMPPCP (100 μM) followed by another identical addition of AMPPCP to check for saturation (and finally a high Ca^{2+} (10 mM, double arrow)) (B). C and D, the Ca^{2+} concentration in the cuvette was first brought up to 10 mM (double arrow), before addition of the same ligands as in A and B, respectively. The small dilution-induced artifacts have been corrected for.

those described above, but quantitatively, the effect of 10 mM Ca^{2+} on AMPPCP-induced and ADP·AlFx-induced fluorescence changes was even more apparent for solubilized ATPase in Fig. 8 than for native SR membranes in Fig. 6: in the presence of detergent and 10 mM Ca^{2+} instead of 50 μM Ca^{2+} , AlCl_3 addition only had a modest effect on top of the increased effect of ADP (panel C versus A), whereas AMPPCP now produced a major increase in fluorescence (panel D versus B).

The same trend was observed when either C_{12}E_8 (Fig. XIII in Supplemental Material) or dodecyl phosphocholine was used (at 5 mM, data not shown) for solubilization of SR membranes, confirming that the effect of a high Ca^{2+} on AMPPCP-dependent changes was more pronounced for solubilized Ca^{2+} -ATPase (*i.e.* under crystallization conditions) than for intact membranes, irrespective of the particular detergent. In the former case, similar results were obtained at three different concentrations of C_{12}E_8 , 0.25, 2.5, or 10 mg/ml (*i.e.* about 0.5, 5, or 20 mM) (data not shown), suggesting there was no effect of ATPase delipidation. In this case, experiments were also repeated in the presence of A23187 ionophore (previously used to quench fluorescence of the Trp residues located near within or close to the transmembrane region), at the lowest (yet fully solubilizing) concentration of detergent: under these conditions the AMPPCP-dependent increase in Trp fluorescence was no longer significantly larger at 10 mM Ca^{2+} than at 50 μM Ca^{2+} (Fig. XIV in Supplemental Material). This is again consistent with the

idea that those Trp residues that are responsible for the increased fluorescence in the presence of high Ca^{2+} , AMPPCP and detergent, are the same as those that give rise, under ordinary conditions, to the ADP·AlFx-dependent fluorescence rise.

We finally took advantage of the larger fluorescence changes observed with solubilized Ca^{2+} -ATPase to ask whether Mg^{2+} and Ca^{2+} at high concentrations had similar effects. The answer was no: an additional 20 mM Mg^{2+} had a weak effect on AMPPCP- and ADP·AlFx-dependent signals in a direction opposite to that of 10 mM Ca^{2+} , but did not prevent 10 mM Ca^{2+} from exerting its own effect (Fig. XV of Supplemental Material).

Beyond these Trp fluorescence experiments, we also used our SH reactivity assay to evaluate whether the above finding, that solubilization made the conformation of ATPase in the presence of AMPPCP and high Ca^{2+} look even more similar to that in the presence of ADP·AlFx, was also true for a completely different conformational index. The answer was yes, again both for C_{12}E_8 -solubilized ATPase (Fig. XVI of Supplemental Material) and for dodecyl phosphocholine-solubilized ATPase (data not shown).

DISCUSSION

The above described experiments confirm the idea that under usual conditions AMPPCP only has a very modest effect on the rate of Ca^{2+} dissociation from non-phosphorylated Ca^{2+} -ATPase. At high Mg^{2+} concentration, this effect consists of a slight slowing down of Ca^{2+} dissociation, as previously reported (12), whereas at lower Mg^{2+} concentration, acceleration is even observed, as now documented in Fig. 1. Acceleration of the rate of Ca^{2+} dissociation in fact seems to be a fairly general feature of the effect of nucleotides, because it is observed at all Mg^{2+} concentrations with both ADP and ATP γS , the latter nucleotide being a poorly hydrolyzable analog of ATP probably resembling ATP more than AMPPCP does (23). As concerns ATP itself, detailed time-resolved phosphorylation experiments previously suggested also that the rate of Ca^{2+} dissociation from Ca^{2+} -ATPase was slightly enhanced (but not much) in the presence of $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$: Ca^{2+} dissociation from the non-covalent $\text{E}\cdot\text{Ca}_2\cdot\text{ATP}$ complex was estimated to occur with a rate constant in the range of 45–80 s^{-1} at 25 °C and pH 7 in the presence of 100 mM KCl and 5 mM Mg^{2+} (13), compared with 25 or 50 s^{-1} in the absence of ATP (depending on whether overall dissociation of the two Ca^{2+} ions or dissociation of the most accessible one is considered) (34). Thus, under ordinary conditions, Ca^{2+} dissociation does not appear to be blocked by the mere binding of nucleotide. In the reverse direction, Ca^{2+} binding to these transport sites was previously demonstrated to be accelerated by nucleotides, including AMPPCP (see references and results in Ref. 26), a fact that again would be hard to understand if the Ca^{2+} -binding sites in $\text{E1}\cdot\text{AMPPCP}$ were to be occluded. Trying to reconcile the now-established fact that Ca^{2+} is strongly occluded in the ATPase·ADP·fluoroaluminate complex but not in the ATPase·AMPPCP complex (under usual conditions in a test tube) with the other now-established fact that a common architecture is found for both complexes in their crystalline forms (3–5) will be the first purpose of the present discussion.

One of our main observations in this work has been that the presence of both AMPPCP and a high millimolar Ca^{2+} concentration (instead of the micromolar Ca^{2+} concentration sufficient for saturating the ATPase high affinity transport sites) definitely affects the ATPase properties and makes the $\text{E1}\cdot\text{AMPPCP}$ complex look more similar to the $\text{E1}\cdot\text{ADP}\cdot\text{AlFx}$ complex, from the point of view of a number of parameters (Figs. 3–6), including the kinetics of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ – $^{40}\text{Ca}^{2+}$ exchange (from which the initial paradox we are trying to solve is derived). This resemblance is even more significant for detergent-

solubilized Ca^{2+} -ATPase (e.g. Fig. 8), i.e. under the conditions prevailing during crystallization. Thus, the simplest way out of our paradox is to consider that the reason why the two crystalline forms of ATPase prepared with AMPPCP or ADP·AlFx have the same architecture (4, 5) is that *under the conditions of crystallization* at very high $[\text{Ca}^{2+}]$ they are rather similar, even if this is not the case under ordinary conditions in a test tube.

One possible reason for this effect of high Ca^{2+} concentrations could be extra binding of Ca^{2+} to a site not recognized in previous descriptions of the x-ray E1·AMPPCP structure: either at the phospholipid/water interface, or close to the negatively charged amphiphilic top portion of M1, or, more simply, at the catalytic site for phosphorylation in the cytosolic domain, previously described as containing Mg^{2+} (4, 5). In the latter view, experiments performed at high Ca^{2+} would simply reveal the properties of ATPase complexed with Ca·AMPPCP instead of AMPPCP or Mg·AMPPCP, i.e. the specific properties of an ATPase-nucleotide complex with Ca^{2+} instead of Mg^{2+} bound at the catalytic site. It is well known that, at high concentrations of Ca^{2+} (or Ln^{3+}), Ca·ATP (or Ln·ATP) may substitute for Mg·ATP for binding to the catalytic site and that the bound Ca^{2+} (or Ln^{3+}) slows down phosphoenzyme processing; remarkably, La^{3+} was previously also found, in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dissociation experiments, to reduce the rate of dissociation of both $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ions (30, 35). In fact, Ca^{2+} itself appears to be able to bind to the corresponding catalytic site in phosphoserine phosphatase, though with an altered coordinate geometry (seven instead of six coordinates), if the crystallization buffer contains 0.7 M Ca^{2+} (36). Thus, the identity of the metal bound to the catalytic site in the crystalline E1·AMPPCP complex of ATPase might be worth re-examining, even though coordinate geometries, distances, and *B* factors in the E1·AMPPCP crystalline form initially suggested that this metal was mostly Mg^{2+} (4, 5). This question could be re-examined by measuring anomalous scattering by Ca^{2+} at an appropriate x-ray wavelength.² On the other hand, if it turns out that E1·AMPPCP crystals do not contain more than contaminating amounts of bound Ca^{2+} (instead of Mg^{2+}) at the catalytic or nucleotide site, or even elsewhere (besides the transport sites), we will have to find an alternative explanation for the effect of high Ca^{2+} concentrations, consistent with the absence of detectable Ca^{2+} in the crystal. For instance, if we assume that a protein's site for Mg^{2+} cannot accommodate Ca^{2+} (instead of Mg^{2+}) together with a certain conformation of bound nucleotide, competition between Mg^{2+} and Ca^{2+} for binding to nucleotide in solution will make that conformation of bound nucleotide unfavorable; thus, the high Ca^{2+} concentration will not result in Ca^{2+} binding, but only in destabilization of a previously bound Mg^{2+} (together with destabilization of that particular conformation of nucleotide), as in fact found in the E1·AMPPCP crystals, which have only one Mg^{2+} ion bound, instead of two in the E1·ADP·AlFx or E2· MgF_4 ·ADP crystals (4–6) (see Supplemental Material for additional discussion).

Having said that the E1·ADP·AlFx and E1·AMPPCP forms in solution are made more similar to each other by the presence of a high Ca^{2+} concentration (and detergent), we can, conversely, discuss the fact that under usual conditions in the test tube they seem to be different. To start with a preliminary point, we can exclude the possibility that this is due to the reversible nature of AMPPCP binding, as opposed to the almost irreversible nature of ADP-fluoroaluminate binding to ATPase: if the exit pathway for Ca^{2+} were to be occluded when AMPPCP sits at its binding site, but open when AMPPCP has dissociated, the rate of Ca^{2+} dissociation should be slowed down to zero at high

[AMPPCP], in proportion with the average statistical occupation by AMPPCP of this site, even in the case of extremely fast dissociation and rebinding of AMPPCP. This is not the case, as AMPPCP concentrations much higher than its K_d (e.g. 100-fold higher, i.e. leaving unoccupied only 1% of the sites) only have a moderate effect on the rate of Ca^{2+} dissociation (Fig. 1B).

A more subtle possibility has been suggested, namely that, even without nucleotide dissociation, the ATPase·AMPPCP complex (and especially the critical M1–M2 hairpin) experiences fluctuations that are sufficient to allow Ca^{2+} dissociation, whereas this flexibility might be lost upon covalent phosphorylation or formation of the quasi-covalent transition state complex (4). Although we agree with the existence of such flexibility in the ATPase·AMPPCP complex and with its possible reduction in the E1·ADP·AlFx transition state complex (especially as concerns slow and large-amplitude fluctuations), we think that this putative slowing down of the protein dynamics must also be accompanied by a significant *shift of the average conformation* of the protein, because invoking the protein dynamics alone cannot account for the differences in Trp fluorescence experimentally observed for the E1·AMPPCP and E1·ADP·AlFx forms (e.g. Figs. 6 and 8). This is because this putative reduction in flexibility due to formation of a transition state analog at the catalytic site is likely not to have much effect on residues located at some distance from the catalytic site and these movements that are fastest and of smallest amplitude. Because the Trp residues in the transmembrane ATPase segments are located far from the catalytic site, this putative reduction in flexibility can therefore be expected not to have much effect on the fast movements (if any) contributing to sub-nanosecond or nanosecond relaxation of the excited state of Trp residues, susceptible to bias the statistical average by Trp fluorescence of conformational states. Experimentally, fast and small amplitude movements of residues in the ATPase transmembrane domain indeed do not seem to be reduced in crystallized ATPase transition state complexes, compared with more usual ATPase complexes, as judged from *B* factors in the corresponding crystals (4–7); in fact, the resolution was reportedly even slightly better with E1·AMPPCP (4).³ Thus, the finding that the ATPase Trp fluorescence does change when going from E1·AMPPCP to E1·ADP·AlFx implies that the dynamic equilibrium between forms of high and low fluorescence is poised differently in the two complexes (and not only slowed down). In other words, even if limited flexibility is present and reduces the frequency with which the E1·ADP·AlFx species may explore the entire conformational space, this species has been stabilized by ADP·AlFx in an average state different from the average state experienced by the E1·AMPPCP complex. Of course, whether the ATPase complex with ADP·AlFx corresponds to an extreme form of the complex with AMPPCP (not representative of the average form of the latter) or to a different one, is then a matter of different phrasing for the same reality.

How the average conformation of the E1·AMPPCP complex looks in solution, we do not yet know. This conformation might differ in the architecture of the polypeptide chain (hence the changes in Trp fluorescence) but also in the conformation of the bound nucleotide. *A priori*, it is clear that ATPase phosphorylation from ATP requires that the γ -phosphate of bound nucleotide comes close to the phosphorylatable Asp³⁵¹ residue, i.e. requires that ATP, bound in particular to domain N of the ATPase, adopts an extended conformation (as found in the crystalline structures) allowing its phosphate chain to reach domain P, where Asp³⁵¹ resides. It is also becoming clear from available structures that this extended conformation of nucle-

² P. Nissen, personal communication.

³ C. Toyoshima, unpublished result.

otide will act as a cross-linker between the N- and P-domains (3–5, 9), stabilizing thermal movements of the polypeptide chain and therefore contributing to occlusion of the Ca²⁺ ions bound at the transport sites, especially if the (kinked) M1 helix blocks flickering of residue Glu³⁰⁹, gating the exit from the Ca²⁺ binding pocket. At this point, however, it might be of interest to recall that different lines of evidence have already suggested that binding of nucleotide to Ca²⁺-saturated ATPase might result (at least in the case of ATP) in the formation of more than one form of ATPase-nucleotide complex (13, 18, 37–46; see further comments in the Supplemental Material).

Going further along this line, it has even been suggested that conformations of the ATPase-nucleotide complex still allowing Ca²⁺ dissociation could be conformations where the bound nucleotide has adopted a *folded* conformation (30), for instance with the phosphate chain close to Thr⁴⁴¹ or Glu⁴³⁹ in the N-domain as suggested by experiments in the presence of Fe²⁺, thought to replace Mg²⁺ (47, 48). Such a bent conformation has already long ago been inferred from NMR experiments in the presence of Mn²⁺, for Co(NH₃)₄ATP bound to Na⁺,K⁺-ATPase (49). The conformation of a given nucleotide in solution, say AMPPCP, is highly dynamic (with average conformation depending on conditions and not necessarily poised toward an extended conformation), and ATPase-nucleotide complexes could indeed exist in two (or more) forms, with bound nucleotide either in a bent conformation providing little stabilization of the cytoplasmic domains and therefore not preventing Ca²⁺ exchange, or in the extended conformation found in the crystals, a conformation providing stabilization of the N-P interaction and therefore favorable for Ca²⁺ occlusion and phosphorylation.

Our results fit best this line of thinking and might imply that, in solution under usual Ca²⁺ conditions, most of the ATPase-nucleotide complexes might *not* adopt the extended conformation seen in the crystal, but might have their nucleotide bound in a different conformation, for instance the conformation suggested by Stewart *et al.* for Na⁺,K⁺-ATPase, and simultaneously would have Ca²⁺ sites with an unblocked exit toward the cytosol (accounting for the fairly fast dissociation of Ca²⁺ observed in ⁴⁵Ca²⁺ filtration or quin2 experiments). The fraction of complexes with the same extended conformation as that found in the crystal would only get larger in the presence of high Ca²⁺ (and detergent). Note that even under those conditions this fraction does not necessarily have to reach 100%, because crystallization constraints are known to have the potential to select particular protein conformations from many possible ones in solution. This is especially fascinating in crystals where the unit cell is found to contain monomers in two different conformations (*e.g.* Ref. 50); another example is provided by the fact that three-dimensional crystals of the E1·Ca₂ form of Ca²⁺-ATPase show a significantly more open cytosolic domain than previous two-dimensional crystals of the same form (1, 51).

Returning to our main conclusion that the E1·AMPPCP average structure under usual conditions in solution probably differs from that illustrated in the crystal, the fact that a crystalline structure does not necessarily reflect the average conformation of a protein in solution is well known to crystallographers. But for more naïve biochemists, the caveat derived from the present results will have to be kept in mind for interpreting present and future structures in terms of average conformational changes of the ATPase during its catalytic cycle. Fortunately enough, in the case of the already published E1·AMPPCP form, the (rare?) conformation of the complex selected in the crystalline form actually turns out to be a very interesting one, in fact the most desirable one,

because it reveals the ATPase transient conformation in which the nucleotide γ -phosphate approaches Asp³⁵¹, leading to phosphorylation at the catalytic site and occlusion at the Ca²⁺ transport sites.

Acknowledgments—We thank G. Lenoir for his help with early SDS-PAGE experiments and A. Troullier (CNRS Unité Mixte de Recherche 7592), J.-M. Neumann, F. André, M. Jidenko-Habets, M. le Maire, S. Orlowski (CEA/DBJC/SBFM), Th. Sørensen, J. V. Møller, and P. Nissen (University of Aarhus) for discussion.

REFERENCES

- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000) *Nature* **405**, 633–634
- Toyoshima, C., and Nomura, H. (2002) *Nature* **418**, 605–611
- Toyoshima, C., Nomura, H., and Sugita, Y. (2003) *FEBS Lett.* **555**, 106–110
- Sørensen, T. L.-M., Møller, J. V., and Nissen, P. (2004) *Science* **304**, 1672–1675
- Toyoshima, C., and Mizutani, T. (2004) *Nature* **430**, 529–535
- Toyoshima, C., Nomura, H., and Tsuda, T. (2004) *Nature* **442**, 361–368
- Olesen, C., Sørensen, T. L.-M., Nielsen, R. C., Møller, J. V., and Nissen, P. (2005) *Science* **306**, 2251–2255
- Vilsen, B., and Andersen, J. P. (1998) *Biochemistry* **37**, 10961–10971
- Inesi, G., Ma, H., Lewis, D., and Xu, C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 31629–31637
- Verjovski-Almeida, S., Kurzmack, M., and Inesi, G. (1978) *Biochemistry* **17**, 5006–5013
- Troullier, A., Girardet, J.-L., and Dupont, Y. (1991) *J. Biol. Chem.* **267**, 22821–22829
- Orlowski, S., and Champeil, P. (1991) *Biochemistry* **30**, 352–361
- Petithory, J. R., and Jencks, W. P. (1986) *Biochemistry* **25**, 4493–4497
- Bayley, P., Ahlström, P., Martin, S. R., and Forsen, S. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 185–191
- Wakabayashi, S., and Shigekawa, M. (1990) *Biochemistry* **29**, 7309–7318
- Champeil, P., Combettes, L., Berthon, B., Doucet, E., Orlowski, S., and Claret, M. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17665–17673
- Champeil, P., Henao, F., and de Foresta, B. (1997) *Biochemistry* **36**, 12383–12393
- Møller, J. V., Lenoir, G., Marchand C., Montigny C., le Maire M., Toyoshima C., Juul B. S., and Champeil, P. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 38647–38659
- Ogawa, Y., Kurebayashi, N., and Harafuji, H. (1986) *J. Biochem. (Tokyo)* **100**, 1305–1318
- Forbush, B. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 11116–11127
- Pang, D. C., and Briggs, F. N. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 3262–3266
- Ross, D. C., and McIntosh, D. B. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12977–12983
- Forge, V., Mintz, E., and Guillain, F. (1993b) *J. Biol. Chem.* **268**, 10961–10968
- Yates, D. W., and Duance, V. C. (1978) *Biochem. J.* **159**, 719–728
- Yasuoka, K., Kawakita, M., and Kaziro, Y. (1982) *J. Biochem. (Tokyo)* **91**, 1629–1637
- Mintz, E., Mata, A. M., Forge, V., Passafiume, M., and Guillain, F. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27160–27164
- Lacapère, J. J., Bennett, N., Dupont, Y., and Guillain, F. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 348–353
- Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., Suzuki, H., and Toyoshima, C. (2001) *FEBS Lett.* **505**, 129–135
- Ma, H., Inesi, G., and Toyoshima, C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 28938–28943
- Inesi, G. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 16338–16342
- Champeil, P., le Maire, M., Møller, J. V., Riollot, S., Guillain, F., and Green, N. M. (1986) *FEBS Lett.* **206**, 93–98
- de Foresta, B., Merah, Z., le Maire, M., and Champeil, P. (1990) *Anal. Biochem.* **189**, 59–67
- de Foresta, B., Champeil, P., and le Maire, M. (1990) *Eur. J. Biochem.* **194**, 383–388
- Petithory, J. R., and Jencks, W. P. (1988) *Biochemistry* **27**, 5553–5564
- Henao, F., Orlowski, S., Merah, Z., and Champeil, P. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10302–10312
- Peeraer, Y., Rabijns, A., Collet, J. F., Van Schaftingen, E., and De Ranter, C. (2004) *Eur. J. Biochem.* **271**, 3421–3427
- Shigekawa, M., and Kanazawa, T. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7657–7665
- Froehlich, J. P., and Heller, P. F. (1985) *Biochemistry* **24**, 126–136
- Mahaney, J. E., Froehlich, J. P., and Thomas, D. D. (1995) *Biochemistry* **34**, 4864–4879
- Coan, C. R., and Inesi, G. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 3044–3049
- Champeil, P., Büschlen-Boucly, S., Bastide, F., and Gary-Bobo, C. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 1179–1186
- Coan, C., and Keating, S. (1982) *Biochemistry* **21**, 3214–3220
- Suzuki, H., Nakamura, S., and Kanazawa, T. (1994) *Biochemistry* **33**, 8240–8246
- Vilsen, B., and Andersen, J. P. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **855**, 429–431
- Vilsen, B., and Andersen, J. P. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3539–3550
- Champeil, P., Henao, F., Lacapère, J.-J., and McIntosh, D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 5795–5803
- Hua, S., Inesi, G., Nomura, H., and Toyoshima, C. (2002) *Biochemistry* **41**, 11405–11410
- Montigny, C., Jaxel, C., Shainskaya, A., Vinh, J., Labas, V., Møller, J. V., Karlsh, S. J. D., and le Maire, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 43971–43981
- Stewart, J. M., Jørgensen, P. L., and Grisham, C. M. (1989) *Biochemistry* **28**, 4695–4701
- Kim, H. Y., Heo, Y. S., Kim, J. H., Park, M. H., Moon, J., Kwann, D., Yoon, J., Shin, D., Jeong, E., Park, S. Y., Lee, T. G., Jeon, Y. H., Ro, S., Cho, J. M., and Hwang, K. Y. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 46651–46658
- Ogawa, H., Stokes, D. L., Sasabe, H., and Toyoshima, C. (1998) *Biophys. J.* **75**, 41–52

SUPPLEMENTAL MATERIAL

For the Ms by Martin Picard, Chikashi Toyoshima and Philippe Champeil:

The average conformation at micromolar $[Ca^{2+}]$ of Ca^{2+} -ATPase with bound nucleotide differs from that adopted with the transition state analog ADP.AIFx or with AMPPCP under crystallization conditions at millimolar $[Ca^{2+}]$.

Possible alternative reasons for the effect of high Ca^{2+} on the properties of the ATPase.AMPPCP complex.

We considered the possibility that a high Ca^{2+} concentration could have resulted in some modification of the phospholipid/water interface. In fact, the top part of M1 helix, dubbed M1', is an amphipathic helix with four negatively charged residues on the same side of the helix (LWE⁵¹LVIE⁵⁵QFE⁵⁸D⁵⁹LLVR⁶³...), and in E1.AMPPCP and E1.ADP.AIFx crystalline forms, M1' is found to kink and lean on what normally is the membrane interface. It could therefore be imagined that by neutralizing phosphates at this interface, a high Ca^{2+} concentration favours the kinked conformation. In this case, the extra Ca^{2+} ions would be bound with poor affinity at this interface, and would therefore probably remain undetected. However, the fact that the effect of 10 mM Ca^{2+} was even more apparent in solubilized ATPase than in native membraneous ATPase, including in the presence of detergent concentrations likely to delipidate the protein to a large extent, does not favour this explanation. We then considered another explanation for stabilization by Ca^{2+} of the E1.AMPPCP structure with a kinked M1': by binding (again with poor affinity, hence probably in an undetectable way in X-ray diffraction patterns) to acidic residues in M1', and especially to Asp⁵⁹, Ca^{2+} could destabilize the salt bridge between Asp⁵⁹ and Arg⁶³ involved in formation of the straight M1 helix (1SU4). In this view, the positive influence of detergent on the effect of high Ca^{2+} could be due to the fact that the transmembrane architecture found in the E1.ADP.AIFx form might occupy a larger cross section in the membrane than that for E1.Ca₂, and therefore would be favoured after the lateral pressure exerted by phospholipids is relieved by solubilization.

Assuming that extra Ca^{2+} is *not* bound in the E1.AMPPCP crystals, the reason for the particular effect of high Ca^{2+} and Mg^{2+} can also be discussed in the context of the hypothesis that bound nucleotide may adopt different conformations on the ATPase, for example either bent or extended conformations. For instance, *a priori*, as the presence of Mg^{2+} between Asp³⁵¹ and Asp⁷⁰³ would reduce electrostatic repulsion between the nucleotide phosphate chain and Asp³⁵¹, it is certainly understandable that Mg^{2+} could favour an extended (cross-linking) conformation of bound nucleotide, so that Ca^{2+} dissociation from its sites in the presence of the Mg^{2+} .AMPPCP complex would be slowed down compared to dissociation in the presence of Mg^{2+} -free AMPPCP (Figures 1B & 5B). But this electrostatic effect, alone, does not allow to understand the different dependence on Mg^{2+} found for various nucleotides (e.g. ATP- γ S, for which the presence of Mg^{2+} *accelerates* Ca^{2+} dissociation instead of slowing it down, see Figure 1C); it is not obvious either with this sole electrostatic effect to understand why a high millimolar Ca^{2+} , instead of Mg^{2+} , could further slow down Ca^{2+} dissociation in the presence of AMPPCP, and why Mg^{2+} and Ca^{2+} would have different effects on the conformation of the

complex. Moreover, if we accept the idea that under usual conditions the major form of bound nucleotide is a folded one, as part of the evidence for this folded form was derived from experiments where Fe^{2+} was supposed to sit at a Mg^{2+} -binding site we must simultaneously admit that this form exists in the *presence* of Mg^{2+} , not only in its absence. We are therefore led to accept that under usual conditions the ATPase.nucleotide complex with the folded nucleotide probably contains two Mg^{2+} ions instead of one (there are indications for this in the literature, e.g. in ref. 27), for instance a first one interacting with the folded phosphate chain (and in some cases close to Thr⁴⁴¹ as suggested by the Fe^{2+} experiments) and a second one close to Asp³⁵¹ and Asp⁷⁰³ of the P-domain; two Mg^{2+} ions are in fact found together with bound ADP in the crystalline E1.ADP.AIFx complex (4, 6) or the crystalline E2.ADP.MgF₄ complexes (6). In this context, if we assume that the Mg^{2+} site close to Glu⁴³⁹ and Thr⁴⁴¹ *cannot* accommodate Ca^{2+} (instead of Mg^{2+}) together with bound (folded) AMPPCP (although AMPPCP free in solution of course binds Ca^{2+}), it is understandable that a high Ca^{2+} concentration will make the folded conformation of bound AMPPCP unfavourable compared with the extended one, and that this site for Mg^{2+} will remain metal-free (as found in the E1.AMPPCP crystals). In other words, the high Ca^{2+} concentration will not result in Ca^{2+} binding, but only in destabilization of a previously bound Mg^{2+} , together with destabilization of the folded conformation of AMPPCP.

Further comments on previous evidence concerning the existence of different forms of ATPase.nucleotide complexes.

Different lines of evidence have already suggested the possibility that binding of nucleotide to Ca^{2+} -saturated ATPase may result in the formation of more than one form of ATPase, at least in the case of Mg.ATP. This was originally deduced from detailed time-resolved phosphorylation experiments, the conclusion of which was that the rate-limiting step for ATPase phosphorylation was *not* phosphorylation itself, but was a conformational change of the E1.Ca₂.ATP complex to a similar but "activated" ^aE1.Ca₂.ATP complex, for which phosphorylation occurred faster than 1000 s^{-1} (13). The existence of a slowly exchanging form of bound nucleotide had already been suggested from the fact that in some cases, phosphoenzyme *increases* after dilution of radioactive ATP with unlabelled ATP (Fig 6 in ref. 37; Fig 4 in ref. 38; Fig 3 in ref. 13). The existence of such an activated form of nucleotide.ATPase complex was considered (39) to be a possible reason for the spectral change of bound spin-labelled iodoacetamide noted long ago to occur in the presence of Ca^{2+} and various nucleotides (40-42), and it might correlate with the second phase of the changes in fluorescence of EDANS-labelled Ca^{2+} -ATPase after ATP addition (43). If the existence of different major forms of nucleotide complexes with Ca^{2+} -saturated Ca^{2+} -ATPase is accepted (of course, many different ATPase forms *are* rapidly interconverting because of the protein dynamics), it is then fairly standard to suggest that crystallization constraints have probably selected a limited number of these forms).

The idea that some (few, in fact) of the conformations of the non-covalent complexes of ATPase with nucleotides already have their Ca^{2+} transport sites already blocked would nicely fit with the established fact that the mere *binding* of Cr.ATP to Ca^{2+} -ATPase, in the absence of phosphorylation, results in slow occlusion of Ca^{2+} (44, 45). It is fair to mention that it would apparently contradict the idea, that one of us previously put forward, that occlusion of the Ca^{2+} transport sites does not immediately accompany ATPase phosphorylation, but rather follows the departure of ADP (46), an apparent contradiction which, however, might reveal the previously noted relative independence (18), again due to protein dynamics, of individual sub-conformations in the transmembrane domain and in the cytosolic domains, respectively.

Figure I. AMPPCP does not block $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dissociation from the ATPase, while preincubation with ADP. AlF_4 does occlude Ca^{2+} (as monitored by rapid filtration).

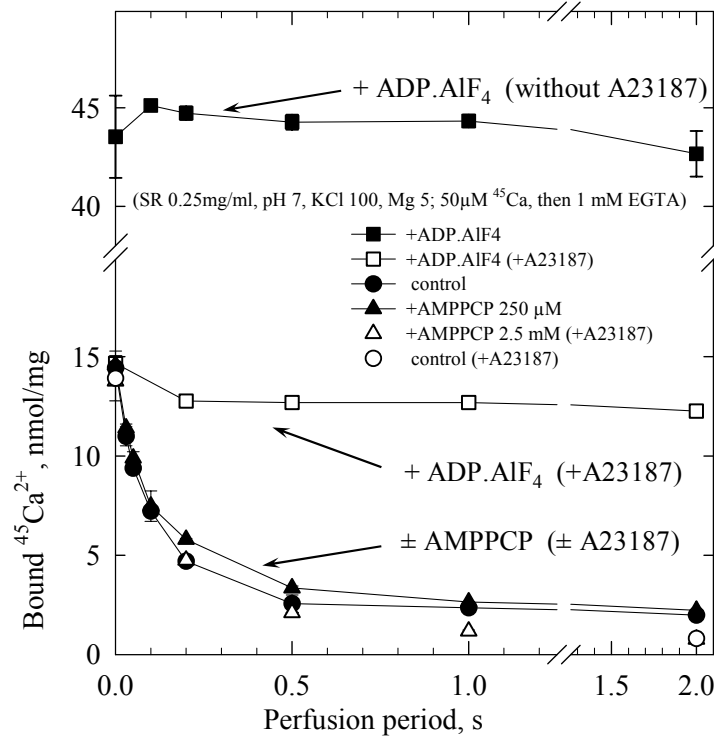


Figure I. Effect of AMPPCP and ADP. AlF_4 on the rate of Ca^{2+} dissociation from SR Ca^{2+} -ATPase, as deduced from $^{45}\text{Ca}^{2+}$ filtration measurements.

For these measurements, 1 ml of ATPase-containing SR membrane suspension (0.25 mg SR protein/ml) was loaded onto a Millipore nitrocellulose (HA) filter (0.45 μm pore diameter). The buffer consisted of 100 mM KCl, 5 mM Mg^{2+} and 50 mM Mops-Tris at pH 7 and 20°C; SR membranes had been equilibrated for 5-15 minutes in this buffer, together with 50 μM $^{45}\text{Ca}^{2+}$ plus 50 μM [^3H]glucose as a volume marker (circles are for control) and, in some cases, 250 μM or 2.5 mM AMPPCP (closed or open triangles), or again 100 μM ADP + 1 mM KF + 50 μM AlCl_3 (squares; ADP was in fact added first to the SR batch, and KF and AlCl_3 were added subsequently, after a few minutes); this incubation was performed in the absence or presence (closed or open symbols, respectively) of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the Ca^{2+} ionophore A23187. The SR membranes adsorbed on the filter were then perfused for various periods of time with buffer supplemented with 1 mM EGTA, again in the absence or presence of AMPPCP or ADP + fluoroaluminate. Data points were measured in triplicates, and averaged.

Comments to Figure I. The amount of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ passively bound to SR vesicles (i.e. at $t=0$) measured was about 14 nmol/mg, out of which about 12 nmol/mg dissociated rapidly, consistent with an ATPase content of about 6 nmol/mg protein. The residual amount of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ found after 2 s perfusion (closed symbols), which was further reduced when ionophore was included in the preincubation medium (open symbols), is presumably due to $^{45}\text{Ca}^{2+}$ having slowly equilibrated passively in the lumen of the vesicles, as previously found at pH 6 (and discussed in ref. 12). AMPPCP (triangles) at either 250 μM or 2.5 mM hardly affected the rate of dissociation of $^{45}\text{Ca}^{2+}$. When SR vesicles were preincubated with ADP and fluoroaluminate in the absence of ionophore and subsequently perfused with EGTA, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was *not* released from the vesicles, but the amount of trapped $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was initially higher (closed squares). The amount of trapped $^{45}\text{Ca}^{2+}$ increased slowly during mere preincubation with ADP (data not shown) and was reversed by ionophore, suggesting that this slow uptake was due to the presence in our vesicles of muscle adenylate kinase, a well known contaminant of SR preparations. In the presence of ionophore during preincubation with ADP and fluoroaluminate (open squares), the initial $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding level was normal and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was again not released from the membranes (except for a very small proportion, presumably bound to non-specific sites), indicative of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ true occlusion.

Figure II: Changes in quin2 fluorescence under different situations involving Ca^{2+} dissociation from quin2 or Ca^{2+} binding to it.

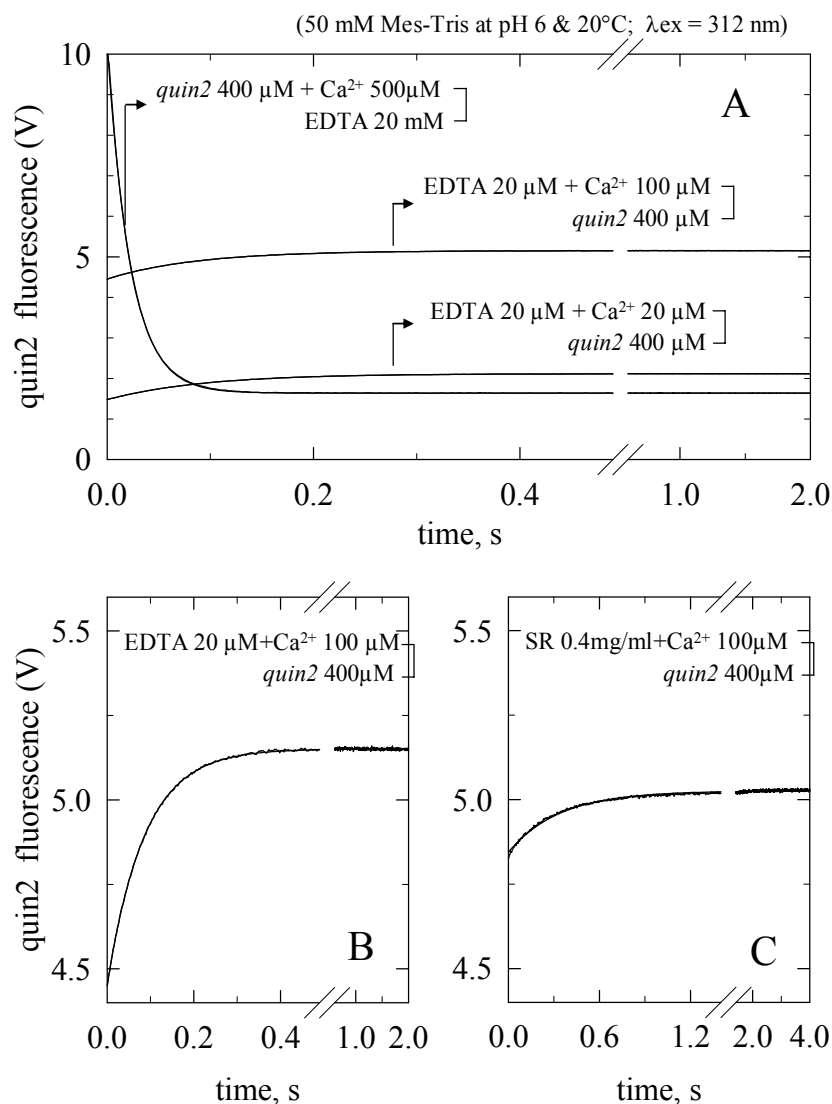


Figure II. Changes in quin2 fluorescence under different situations (Methods).

The buffer consisted of 50 mM Mes-Tris at pH 6 and 20°C. *Panel A*, for the experiment illustrated by the top trace, a solution containing 400 μM quin2 and 500 μM Ca^{2+} was mixed in a one to one volume, in a stopped-flow device, with a solution containing 20 mM EDTA. For the bottom trace, a solution containing 20 μM EDTA and 20 μM Ca^{2+} in buffer was mixed with a solution containing 400 μM quin2. For the intermediate trace, a solution containing 20 μM EDTA and 100 μM Ca^{2+} was mixed with 400 μM quin2. *Panel B*, same trace as the latter one, but plotted on a different scale. *Panel C*, a solution containing 0.4 mg/ml SR vesicles and 100 μM Ca^{2+} (in the same buffer) was mixed with 400 μM quin2. In all cases, quin2 fluorescence, excited at 312 nm, was monitored, and plotted as the photomultiplier output. Experimental data points and monoexponential fits (to $y = y_0 + a.(1 - e^{-bx}) + c.x$) have been superimposed (at this scale, they are indistinguishable).

Comments to Figure II. The top trace in *Panel A* of this Figure shows that when quin2 is first complexed with Ca^{2+} and then mixed in a one to one volume with a much larger concentration of a non fluorescent chelator like EDTA (EGTA can also be used, depending on pH and Mg^{2+} , which influence the K_d of the non-fluorescent chelator relative to that of quin2), quin2 fluorescence, excited at 312 nm (a wavelength where our mercury-doped Xenon lamp has a high intensity), drops, because the $\text{Ca}.$ quin2 complex dissociates. In contrast, when a preformed complex of non-fluorescent chelator with Ca^{2+} is mixed with excess quin2 (bottom trace in *Panel A*), the Ca^{2+} -chelator complex dissociates and the released Ca^{2+} now binds to quin2 and raises its fluorescence. If excess free Ca^{2+} is present together with the initial chelator complex (middle trace in *Panel A*), it binds to quin2 with no delay on this time scale (i.e. within the mixing time of the stopped-flow device, about 3 ms), and the similar time-course of the observed fluorescence rise therefore reflects the rate of Ca^{2+} dissociation from the complex. All traces are remarkably monophasic (*Panels A & B*), and nicely reveal the dissociation rates of the

Ca^{2+} complexes with either quin2 or the non-fluorescent chelator. If excess quin2 is now mixed with SR membranes pre-equilibrated with Ca^{2+} (*Panel C*), the fluorescence rise as a function of time now monitors Ca^{2+} dissociation from the SR ATPase Ca^{2+} binding sites. By comparison with the previous control obtained with 20 μM EDTA in *Panel B*, the amplitude of the quin2 fluorescence rise in *Panel C* also provides a fair estimate of the concentration of the binding sites in SR ATPase: about 5 μM in the enzyme syringe (which contains 0.4 mg/ml SR protein), i.e. 12-13 nmol/mg protein, a number in agreement with previous estimates of the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding stoichiometry in our membranes (12). The monophasic fluorescence rise is generally followed by a hardly visible (but real) much slower upwards drift, which probably corresponds to slow Ca^{2+} release from the lumen of the vesicles and which is taken into account to estimate the true rate constant for Ca^{2+} dissociation.

Figure III. Effect of AMPPCP on the rate of Ca^{2+} dissociation from Ca^{2+} -ATPase at pH 6, in the absence or presence of 20 mM Mg^{2+} .

SR 0.4 mg/mL + Ca^{2+} 100 μM \pm AMPPCP
 quin2 400 μM \pm AMPPCP] (50 mM Mes-Tris \pm Mg^{2+} , pH 6, 20°C)

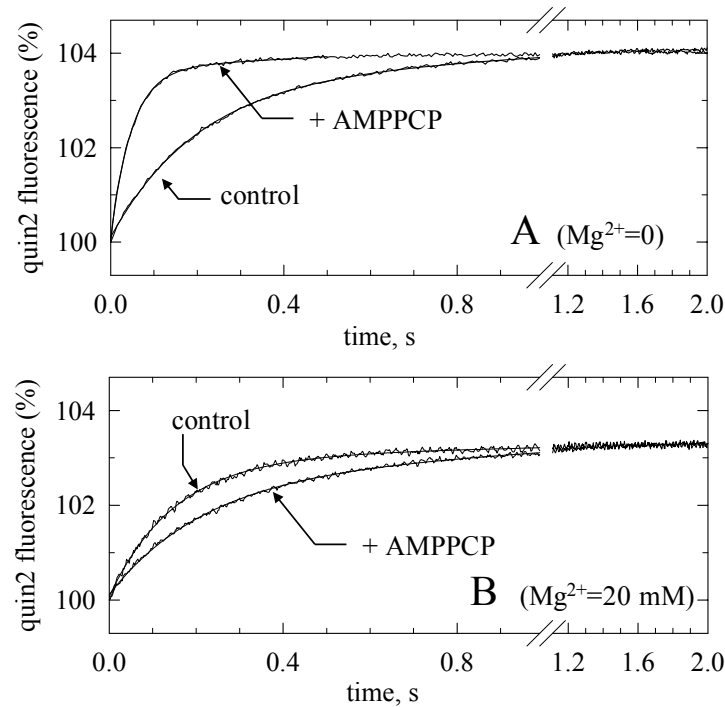


Figure III. Effect of AMPPCP on the rate of Ca^{2+} dissociation from SR Ca^{2+} -ATPase in the absence or presence of 20 mM magnesium, as deduced from quin2 fluorescence measurements.

Sarcoplasmic reticulum membranes (SR, 0.4 mg/ml) were pre-incubated with calcium (100 μM) at pH 6 and 20°C in 50 mM Mes-Tris, in the absence (*Panel A*) or presence (*Panel B*) of 20 mM Mg^{2+} , and in the absence or presence (as indicated on each trace) of 250 μM AMPPCP. This suspension was mixed in a one to one volume in a stopped-flow device with quin2 (400 μM), again in the absence or presence of Mg^{2+} or AMPPCP. Quin2 fluorescence, excited at 312 nm, was normalized to its initial level after mixing. Monoexponential fits (to $y = y_0 + a.(1 - e^{-bx}) + c.x$) and experimental data points have been superimposed.

Incidentally, note that in the absence of AMPPCP, raising the Mg^{2+} concentration up to 20 mM Mg^{2+} slightly stimulated the rate of Ca^{2+} dissociation, compared to the absence of Mg^{2+} (see Fig 1C in main text), but this stimulation vanished in the additional presence of 100 mM KCl (data not shown).

Figure IV. Effect of ATP γ S on Ca $^{2+}$ dissociation from Ca $^{2+}$ -ATPase at pH 6 in the absence or presence of Mg $^{2+}$.

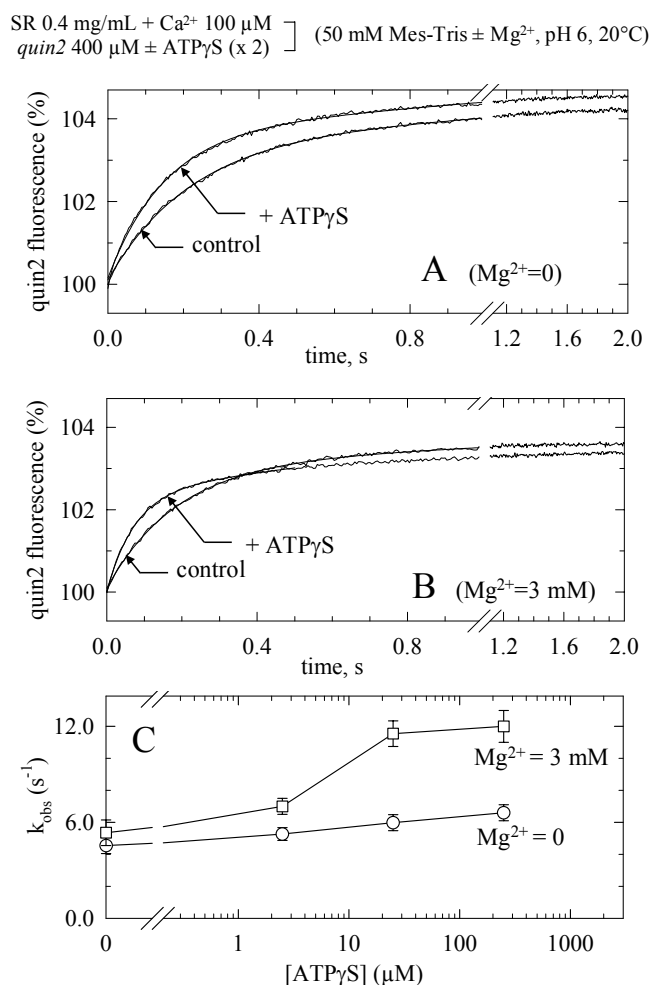


Figure IV. Effect of ATP γ S on the rate of Ca $^{2+}$ dissociation from SR Ca $^{2+}$ -ATPase in the absence or presence of magnesium, as deduced from quin2 fluorescence measurements.

Sarcoplasmic reticulum membranes (SR, 0.4 mg/ml) were pre-incubated with calcium (100 μ M) at pH 6 and 20°C in 50 mM Mes-Tris, in the absence (*Panel A*) or presence (*Panel B*) of 3 mM Mg $^{2+}$. This suspension was mixed vol:vol in a stopped-flow device with quin2 (400 μ M), to which 500 μ M ATP γ S had been added if indicated. Quin2 fluorescence, excited at 312 nm, was normalized to its initial level after mixing. Monoexponential fits (to $y = y_0 + a.(1 - e^{-bx}) + c.x$) and experimental data points have been superimposed. Similar measurements were performed at various ATP γ S concentrations. All rate constants are plotted in *Panel C* as a function of the *final* ATP γ S concentration.

Comments to Figure IV. It can be noted that in *Panel B*, the *amplitude* of the trace corresponding to Ca $^{2+}$ dissociation was slightly smaller in the presence of ATP γ S than in its absence. A simple explanation for this is that ATPase thio-phosphorylation probably occurred upon mixing, to a small extent, and resulted in occlusion of a fraction of the initially bound Ca $^{2+}$ ions, making it no longer available for quin2. This interpretation was tested by making an additional series of experiments, now with ATP itself instead of ATP γ S. In this case too, the amount of Ca $^{2+}$ released towards the cytosol as a result of quin2 addition is expected to be diminished because of the competition between Ca $^{2+}$ dissociation and ATP-induced phosphorylation followed by occlusion (and subsequent release towards the vesicle lumen). When 250 μ M of Na $_2$.ATP (instead of ATP γ S) was present together with quin2, the amplitude of the rise in quin2 fluorescence after mixing was indeed strongly diminished (data not shown), by more than 80 and 90 % in the presence of 3 and 20 mM Mg $^{2+}$, respectively, and also by close to half in the nominal absence of Mg $^{2+}$ (presumably because of contaminant Mg $^{2+}$, or because of ATPase phosphorylation from Ca.ATP instead of the normal substrate Mg.ATP). Part of the apparently larger increase of the Ca $^{2+}$ dissociation rate constant in the presence of Mg $^{2+}$ compared to its absence is probably due to this reduction in amplitude.

Figure V. Effect of Mg^{2+} on ATP binding to ATPase : as well known, Mg^{2+} increases the ATPase affinity for ATP in the absence of Ca^{2+} .

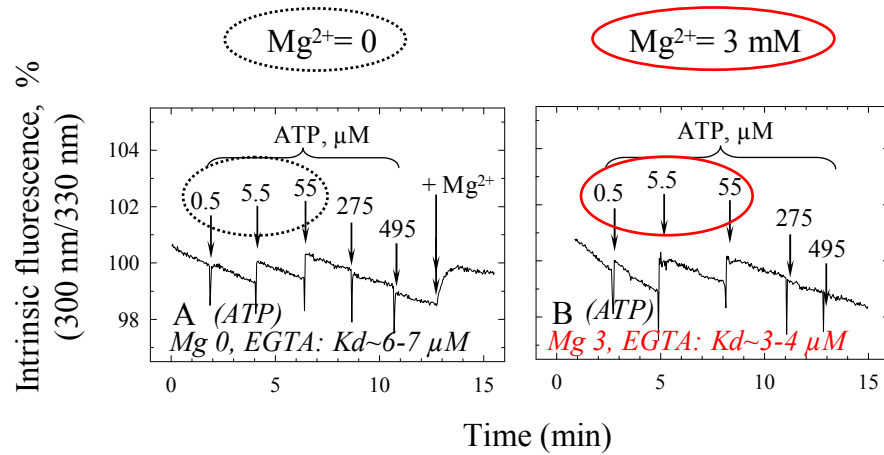


Figure V. Effect of Mg^{2+} on ATP-induced changes in ATPase fluorescence in the absence of Ca^{2+} .

Panel A, sarcoplasmic reticulum membranes were suspended at 0.08 mg/ml in a medium containing 50 mM Mes-Tris (pH 6 and 20°C). EGTA (0.5 mM) was first added, followed by 0.5 mM EDTA for Panel A and 3 mM Mg^{2+} for Panel B (not shown); then, ATP was sequentially added, at the final total concentrations indicated (in μM). This involved only minimal dilution (typically 2 μl of concentrated ligand into 2 ml); these small dilution-induced artifacts have been corrected for. Fluorescence emission at 330 nm was recorded with excitation set at 300 nm, to minimize inner filter effects due to nucleotide at the highest concentrations. The equilibrium dissociation constant for nucleotide deduced from each curve has been indicated on the corresponding Panel.

Comments to Figure V. The maximal amplitude of the ATP-induced fluorescence rise was smaller in the absence than in the presence of Mg^{2+} (Panel A versus Panel B), as previously noted (27), and accordingly addition of Mg^{2+} after ATP in Panel A raised the fluorescence level further (double arrow in Panel A). Note also that in contrast with the above-illustrated Mg^{2+} -dependence of the effect of ATP, the effect of ADP binding was not dependent on Mg^{2+} (data not shown), again as previously reported (27).

Figure VI. In the absence of Mg^{2+} , too, the apparent K_d for AMPPCP binding to SR ATPase is sensitive to Ca^{2+} not only when Ca^{2+} binds to the high affinity transport sites, but also when Ca^{2+} is increased to a millimolar value.

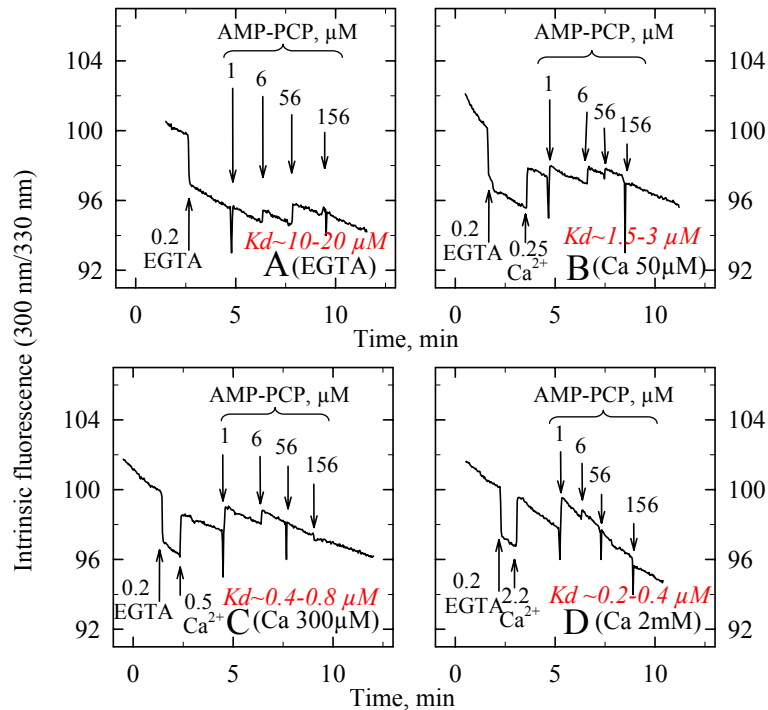


Figure VI. Effect of Ca^{2+} on AMPPCP-induced changes in ATPase Trp fluorescence in the absence of Mg^{2+} (at pH 6.5) : increasing the Ca^{2+} concentration beyond the level required for saturation of the transport sites again increases the ATPase affinity for AMPPCP further.

Same experiment as the one illustrated in Figure 2 of main text, except that the medium now contained 100 mM Mops-NaOH at pH 6.5 (20°C) and no Mg^{2+} . Sarcoplasmic reticulum membranes (SR, 0.1 mg/ml) were suspended in this medium, then 0.2 mM EGTA was added, followed for *Panels B-D* by various total concentrations of Ca^{2+} (EGTA and total Ca^{2+} concentrations are indicated in mM), and then AMPPCP at the final total concentrations indicated (in μM). This involved only minimal dilution (typically 2 μl of concentrated ligand into 2 ml), and in this particular figure, these small dilution-induced artifacts have *not* been corrected for. Fluorescence emission was recorded at 330 nm, with excitation at 300 nm, to minimize inner filter effects due to nucleotide, but the same pattern was found with excitation at 294 nm, where the Ca^{2+} -induced signal is larger (not shown). The equilibrium dissociation constants for nucleotide estimated from each curve have been indicated, close to the free Ca^{2+} concentration prevailing during the assay. In the additional presence in the medium of either 100 mM KCl or 5 mM Mg^{2+} , affinities for AMPPCP binding were slightly poorer than those shown here but were again sensitive to variations in Ca^{2+} between 20 μM and 2 mM (not shown).

Comments to Figure VI. Note that while nucleotides have been known for long to raise the intrinsic fluorescence level of Ca^{2+} -ATPase to a level *intermediate* between those of the Ca^{2+} -free and Ca^{2+} -bound forms (e.g. ref.s 27, 23), what we show here and in Figure 2 of the main text is that in the presence of Ca^{2+} , AMPPCP brings ATPase fluorescence to a level *higher* than that of the Ca^{2+} -bound form (see more on this below).

Figure VII. AMPPCP binding at millimolar Ca^{2+} (not submillimolar Ca^{2+}) almost fully protects ATPase from proteolysis by proteinase K at pH 7.2 and 1mM Mg^{2+} .

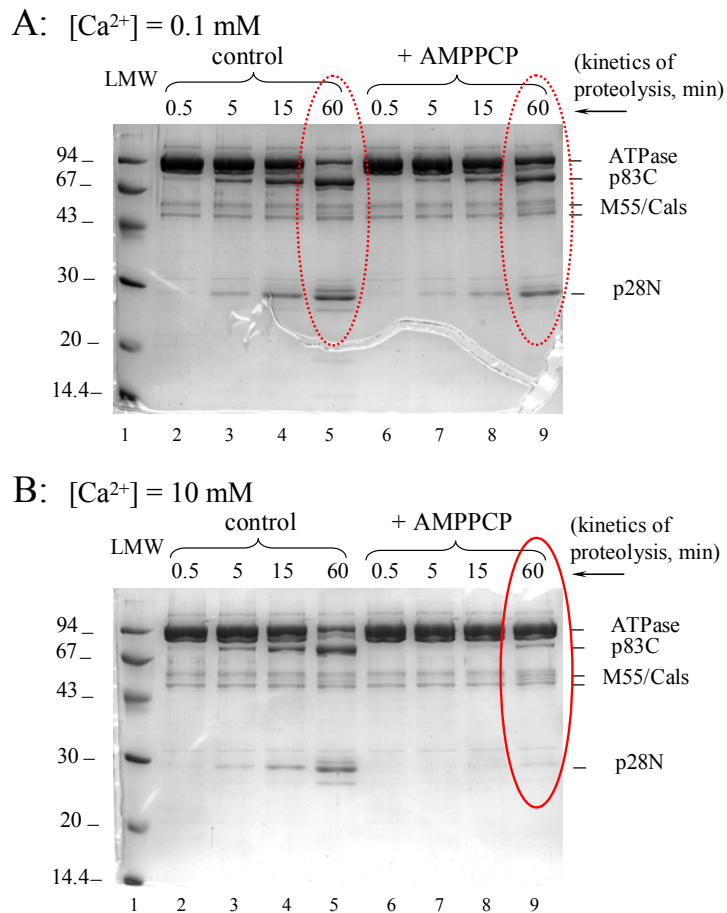


Figure VII. AMPPCP binding at millimolar Ca^{2+} (but not submillimolar Ca^{2+}) almost fully protects ATPase from proteolysis by proteinase K at pH 7.2 also.

Experiment similar to the one in Figure 3 of main text, now performed at pH 7.2. SR Ca^{2+} -ATPase (2 mg/ml) was treated for various periods with Proteinase K (0.03 mg/ml) at 20°C in proteolysis buffer containing 100 mM Mops-NaOH (pH 7.2), 100 mM NaCl, 1 mM Mg^{2+} and either 0.1 mM Ca^{2+} (*Top Panel*) or 10 mM Ca^{2+} (*Bottom Panel*), in the absence (lanes 2-5) or presence (lanes 6-9) of, here, 0.2 mM AMPPCP. Lane 1 shows molecular mass standards (Pharmacia LMW).

Figure VIII. At pH 7.5 instead of pH 8, 10 mM Ca^{2+} makes SR vesicles aggregation after reaction with DTNB dramatic, but AMPPCP again reduces SH reactivity and aggregation is also reduced..

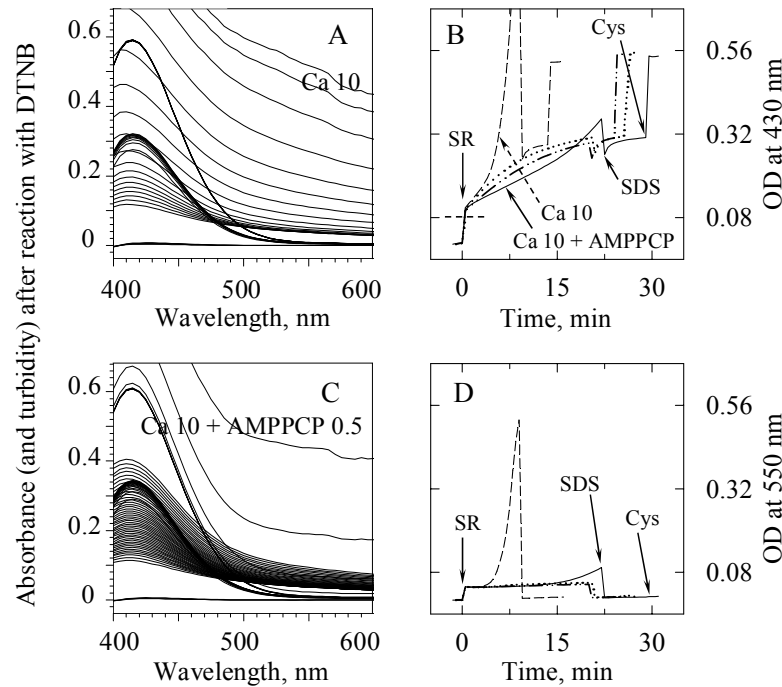


Figure VIII. At pH 7.5 instead of pH 8, 10 mM Ca^{2+} makes SR vesicles aggregation after reaction with DTNB dramatic, but AMPPCP again reduces SH reactivity and aggregation is also reduced.

SR vesicles (0.15 mg protein/ml, i.e. about 1 μM ATPase) were added to a medium (25 $^{\circ}\text{C}$) now containing 2 mM DTNB, 100 mM Tes-Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM Mg^{2+} , and either 0.05 mM Ca^{2+} or 10 mM Ca^{2+} , in the absence or presence of 0.5 mM AMPPCP. Reaction with DTNB was monitored by taking full spectra every half a minute, as shown in *Panels A & B* for the experiments performed at 10 mM Ca^{2+} without (*Panel A*) or with (*Panel B*) AMPPCP. After some time, 1 mg/ml SDS was added (resulting in SR vesicle solubilization), to allow more slowly-reacting SH groups to nevertheless react with DTNB, and lastly L-cysteine was added (20 μM), for internal calibration. In *Panels C and D*, we plotted optical densities at 430 nm (*Panel C*) and 550 nm (*Panel D*), respectively. As for Figure 5 in main text, conditions for the various traces in *Panels C & D* are: 10 mM Ca^{2+} + AMPPCP (continuous lines); 10 mM Ca^{2+} only (dashed lines); 0.05 mM Ca^{2+} + AMPPCP (dash-dot-dot lines); 0.05 mM Ca^{2+} only (dotted lines). On the Y scale on the right of *Panel C*, the tick spacing ($\Delta\text{OD}_{430}=0.24$) corresponds to reaction with DTNB of about 20 SH groups per ATPase, the numbers of ATPase groups expected to be reactive to DTNB. In *Panel C*, the horizontal dashed line represents the OD_{430} (about 0.08) that should be observed, because of turbidity alone, immediately after SR vesicles addition; the difference between this line and the initial OD_{430} values reveals the fast-reacting SH groups.

Figure IX. Upon formation of $E1Ca_2/ADP/AlF_4$ complex, SH reactivity towards Ellman's reagent is reduced, but not to zero.

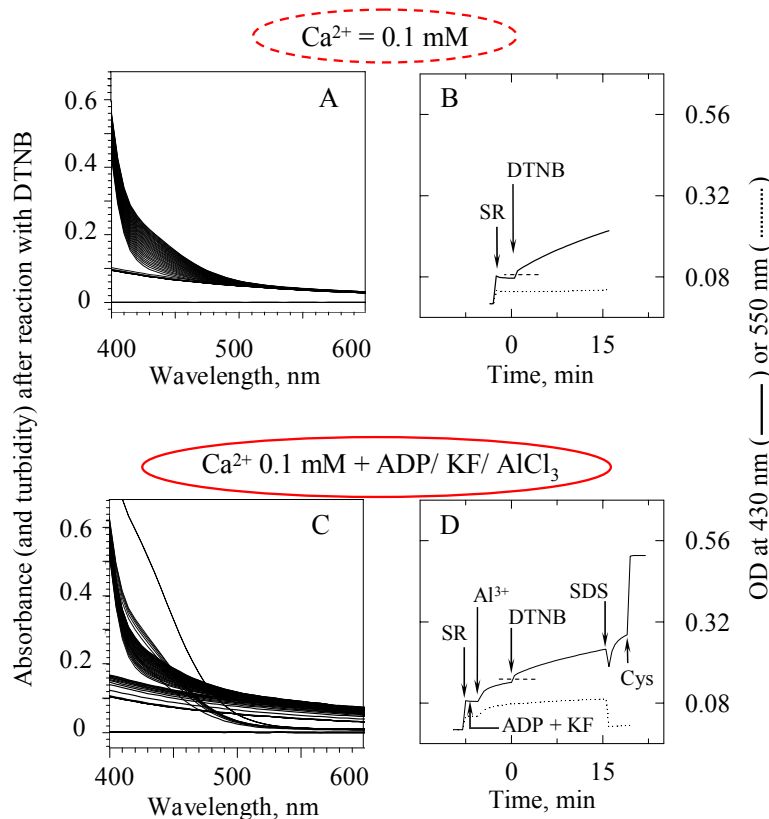


Figure IX. Upon formation of $E1Ca_2/ADP/AlF_x$ complex, SH reactivity towards Ellman's reagent is reduced, but not to zero.

Here, the blank spectrum was recorded with DTNB-free buffer. SR vesicles (0.15 mg protein/ml, i.e. about 1 μM ATPase) were first added to a medium (25 °C) containing 100 mM Tes-Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM Mg^{2+} and 0.1 mM Ca^{2+} , resulting in a simple turbidity spectrum. *Panels A & B*, 0.5 mM DTNB was then added at time zero. On *Panel A*, DTNB absorption at short wavelengths is visible, as well as the color development due to DTNB reaction with SH groups, in the quasi-absence of any change in turbidity; on *Panel B*, OD₄₃₀ and OD₅₅₀ are plotted (continuous and dotted line, respectively). *Panels C & D*, after SR, 100 μM ADP, 1 mM KF were added, and then 50 μM $AlCl_3$; unexpectedly, aluminium addition triggered some increase in turbidity. At time zero, DTNB was then added, later followed by SDS and cysteine as in *Figure VIII*. *Panel C* shows the recorded spectra, and OD₄₃₀ and OD₅₅₀ are replotted in *Panel D* (continuous and dotted line, respectively). On the Y scale on the right of *Panel C*, the tick spacing ($\Delta OD_{430}=0.24$) corresponds to reaction with DTNB of about 20 SH groups per ATPase, the numbers of ATPase groups expected to be reactive to DTNB. In *Panels B & D*, the horizontal dashed lines represent the OD₄₃₀ that should be observed because of turbidity plus DTNB absorption before any reaction of SH groups, again revealing the existence of one or two fast reacting SH groups per ATPase.

Figure X. At pH 6 and 3 mM Mg²⁺, the presence of 20 mM ⁴⁰Ca²⁺ together with AMPPCP slows down ⁴⁵Ca²⁺ -⁴⁰Ca²⁺ exchange to a very large extent.

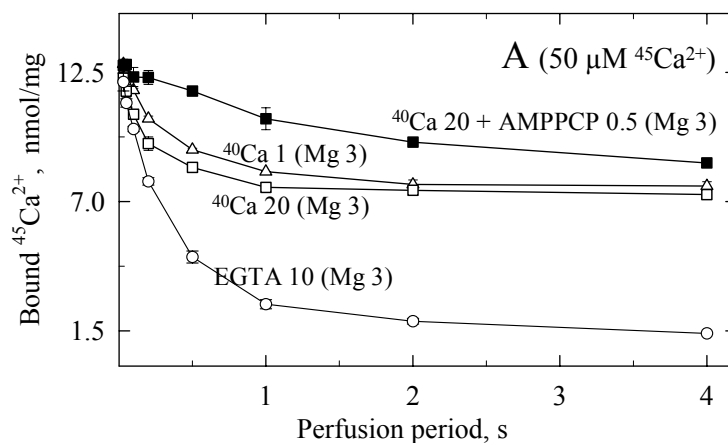


Figure X. At pH 6 and 3 mM Mg²⁺, the presence of 20 mM ⁴⁰Ca²⁺ together with AMPPCP slows down ⁴⁵Ca²⁺ -⁴⁰Ca²⁺ exchange to a very large extent, whereas the presence of 20 mM ⁴⁰Ca²⁺ alone does not.

1 ml of ATPase-containing SR membrane suspension (0.25 mg SR protein/ml) was loaded onto a Millipore nitrocellulose (HA) filter (0.45 μm pore diameter). The buffer consisted of 3 mM Mg²⁺ and 50 mM Mes-Tris at pH 6 and 20°C. The SR membranes had been previously equilibrated for 5-15 minutes with 50 μM ⁴⁵Ca²⁺ (plus 50 μM [³H]glucose as a volume marker). The adsorbed membranes were then perfused for various periods of time with Mg²⁺-containing buffer supplemented with 10 mM EGTA (open circles), 1 mM ⁴⁰Ca²⁺ (open triangles), 20 mM ⁴⁰Ca²⁺ (open squares), or 20 mM ⁴⁰Ca²⁺ plus 0.25 mM AMPPCP (closed squares).

Figure XI: Poor effect of AlF_4 in the absence of Ca^{2+} on ATPase intrinsic fluorescence, as previously described by Troullier et al. (1992).

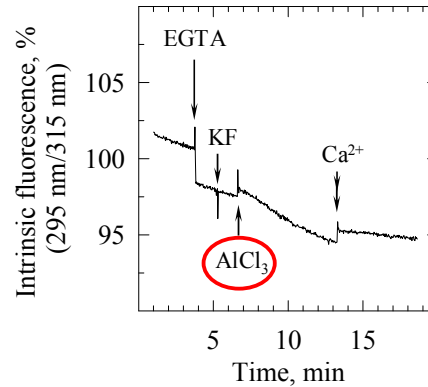


Figure XI. Poor effect of AlF_4 in the absence of Ca^{2+} on the ATPase intrinsic fluorescence, as previously described by Troullier et al. (1992) (ref. 11).

SR vesicles (0.1 mg/ml) were suspended in a medium containing 100 mM KCl, 50 mM Mops-Tris and 5 mM Mg^{2+} at pH 7 and 20°C, and intrinsic fluorescence was examined with excitation and emission wavelengths of 295 and 315 nm, respectively (respective spectral bandwidths were 2 and 10 nm). Additions were: first EGTA (240 μM , to chelate contaminating and/or endogenous Ca^{2+} , a few micromolar total), and then KF (1 mM), AlCl_3 (50 μM) and lastly excess Ca^{2+} (285 μM , to reach a free $[\text{Ca}^{2+}]$ of about 50 μM): the reduced rise induced by the latter addition after a few minutes reveals ongoing inhibition by fluoroaluminate and is consistent with Fig 1 in Troullier et al.

Figure XII. ADP/AlF₄ raises the Ca²⁺-ATPase intrinsic fluorescence to a level higher than that of E1.AMPPCP, and in contrast with the rise induced by AMPPCP, this involves Trp residues sensitive to quenching by A23187.

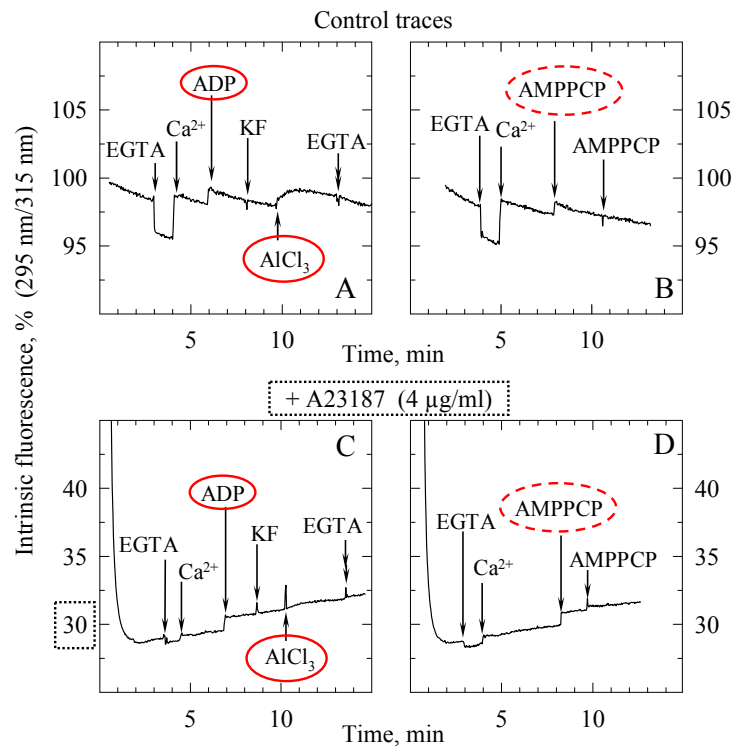


Figure XII. ADP/AlF₄ raises the ATPase intrinsic fluorescence to a level *higher* than that of E1.AMPPCP, and this involves Trp residues *sensitive* to quenching by A23187.

SR vesicles (0.1 mg/ml) were suspended in a medium containing 100 mM KCl, 50 mM Mops-Tris and 5 mM Mg²⁺ at pH 7 and 20°C, and intrinsic fluorescence was examined, here with excitation and emission wavelengths of 295 and 315 nm, respectively (respective spectral bandwidths were 2 and 10 nm). For *Panels C & D*, 4 μg/ml A23187 was also added to the SR vesicles from the start (hence the initial drop visible on the Figure). Initial addition to the cuvette of EGTA first (240 μM, to chelate contaminating and/or endogenous Ca²⁺, a few micromolar total) and then excess Ca²⁺ (285 μM, to reach a free [Ca²⁺] of about 50 μM and thus obtain the “Ca₂E1” form) served as an “internal calibration” of the fluorescence changes. Then, various ligands were added: either ADP (100 μM), KF (1 mM), AlCl₃ (50 μM) and then EGTA again (2 mM) (*Panels A & C*), or AMPPCP (100 μM) followed by another identical addition of AMPPCP to check for saturation (*Panels B & D*).

Comments: 315 nm was chosen here as the emission wavelength, but formation of the E1.AlFx.ADP form was detectable by Trp fluorescence irrespective of the emission wavelength between 315 nm and 355 nm (data not shown). Similar results were obtained using 5 μg/ml BrA23187 instead of 4 μg/ml A23187 to quench ATPase fluorescence (data not shown). Fluorescence changes (and Ca²⁺ occlusion, as judged from the lack of effect of subsequent addition of EGTA) upon fluoroaluminate addition were also observed in the presence of 0.25 mg/ml of the nonionic detergent C₁₂E₈ (as well as of Ca²⁺ and ADP), i.e. under solubilizing conditions (e.g. in *Figure XIV* below).

Figure XIII. In the presence of a solubilizing concentrations of detergent (here $C_{12}E_8$ at 2.5 mg/ml, *i.e.* about 5mM), the effect of 10 mM Ca^{2+} on ADP.AIFx- and AMPPCP-induced changes is prominent, as with DDM.

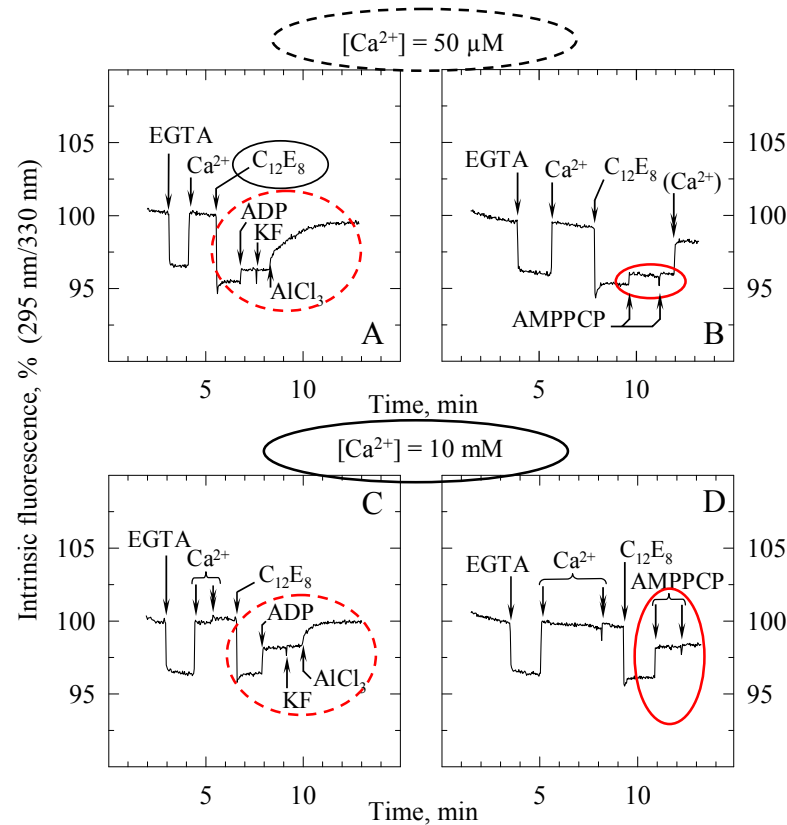


Figure XIII. In the presence of a solubilizing concentration of detergent (here $C_{12}E_8$ at 2.5 mg/ml), the effect of 10 mM Ca^{2+} on ADP.AIFx- and AMPPCP-induced changes is more prominent (as also observed with DDM as the solubilizing detergent).

Experiment similar to that in Figure 8, except that 2.5 mg/ml $C_{12}E_8$ instead of DDM was added to the cuvette after the initial calibration of the Trp fluorescence signal with EGTA and Ca^{2+} . SR vesicles (0.1 mg/ml) were suspended in a medium containing 100 mM KCl, 50 mM Mops-Tris and 5 mM Mg^{2+} at pH 7 and 20°C, and intrinsic fluorescence was examined with excitation and emission wavelengths of 295 and 330 nm, respectively (respective spectral bandwidths were 2 and 10 nm). Initial addition to the cuvette of EGTA first (240 μM , to chelate contaminating and/or endogenous Ca^{2+} , a few micromolar total) and then excess Ca^{2+} (285 μM , to reach a free $[Ca^{2+}]$ of about 50 μM and thus obtain the “ Ca_2E1 ” form) served as an “internal calibration” of the fluorescence changes. Then, various ligands were added: either $C_{12}E_8$ (2.5 mg/ml), ADP (100 μM), KF (1 mM) and $AlCl_3$ (50 μM) (Panel A), or $C_{12}E_8$ (2.5 mg/ml) and AMPPCP (100 μM) followed by another identical addition of AMPPCP to check for saturation (and finally a high Ca^{2+} (10 mM, double arrow)) (Panel B). Panels C & D, the Ca^{2+} concentration in the cuvette was first brought up to 10 mM (double arrow), before addition of the same ligands as in Panels A & B, respectively. The small dilution-induced artefacts have been corrected for.

Figure XIV. In the presence of detergent and A23187 used as quencher, the AMPPCP-dependent increase in residual fluorescence is *not* larger at 10 mM Ca^{2+} than at 50 μM Ca^{2+} .

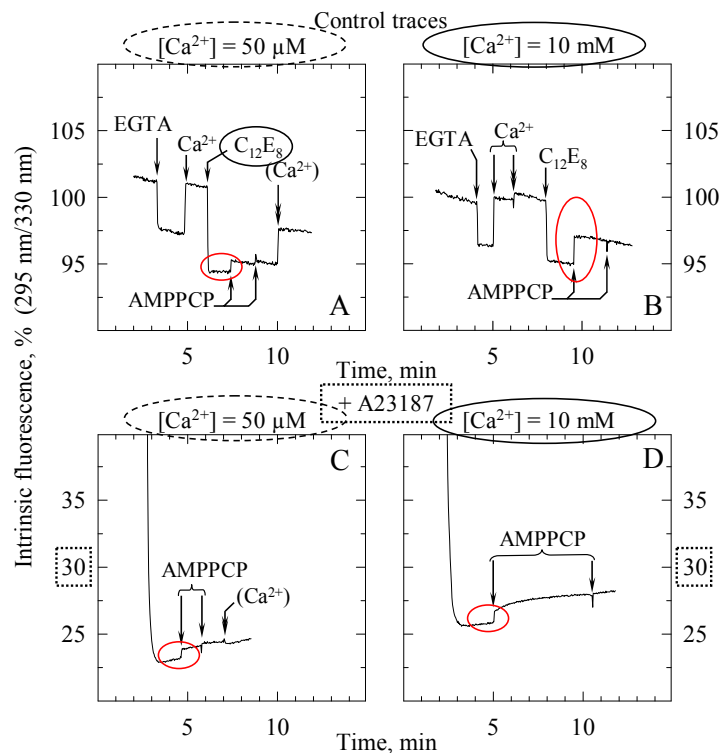


Figure XIV. In the presence of detergent and A23187 used as quencher, the AMPPCP-dependent increase in residual fluorescence is *not* larger at 10 mM Ca^{2+} than at 50 μM Ca^{2+} .

Experiment similar to the one illustrated in *Figure XII B&D*, except for a few modifications, as follows. SR vesicles were suspended in a medium containing 100 mM KCl, 50 mM Mops-Tris and 5 mM Mg^{2+} at pH 7 and 20°C, and intrinsic fluorescence was examined, here with excitation and emission wavelengths of 295 and 330 nm, respectively (respective spectral bandwidths were 2 and 10 nm). Initial addition to the cuvette of EGTA first (240 μM , to chelate contaminating and/or endogenous Ca^{2+} , a few micromolar total) and then excess Ca^{2+} (285 μM , to reach a free $[\text{Ca}^{2+}]$ of about 50 μM and thus obtain the “ $\text{Ca}_2\text{E1}$ ” form) served as an “internal calibration” of the fluorescence changes. For *Panels B & D*, 10 mM Ca^{2+} was added (double arrow in *Panel B*). Then, in all cases, C_{12}E_8 at 0.25 mg/ml was added. Then for *Panels C & D*, A23187 was also added (7 or 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively), hence the initial drop visible on these Panels. Then, in all cases, AMPPCP was added (100 μM), followed by another identical addition of AMPPCP to check for saturation. A high Ca^{2+} (10 mM, double arrow) was added at the end for *Panels A & C*.

Figure XV. The effect of an additional 20 mM Mg^{2+} on ADP.AIFx- and AMPPCP-induced changes is *not* similar to that of 10 mM Ca^{2+} .

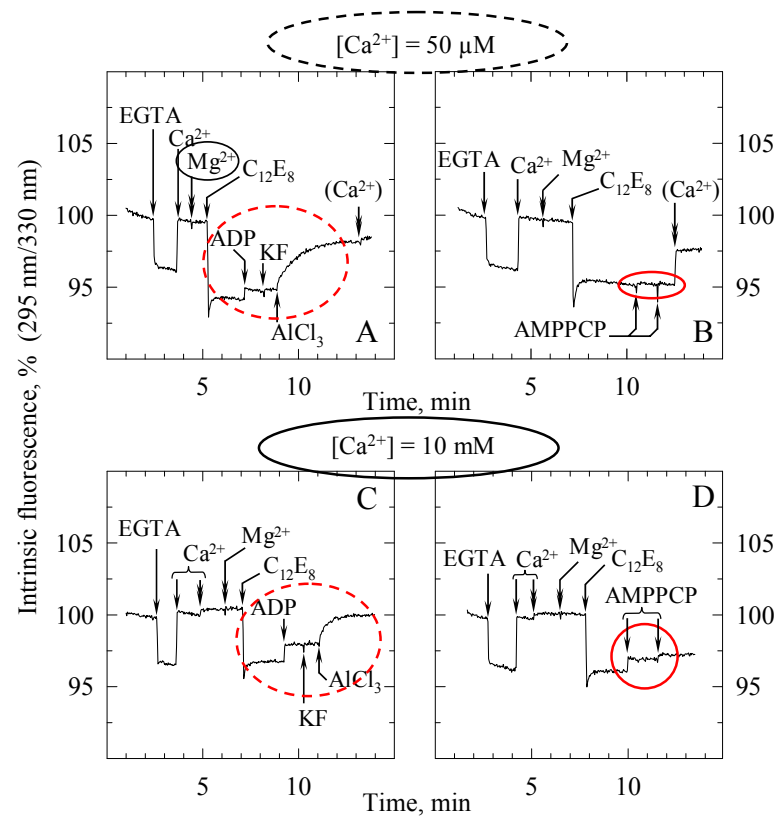


Figure XV. The effect of an additional 20 mM Mg^{2+} on ADP.AIFx- and AMPPCP-induced changes is *not* similar to that of 10 mM Ca^{2+} .

Experiment similar to that in Figure XIII, except that 20 mM Mg^{2+} was added (resulting in a final total concentration of 25 mM Mg^{2+}) before $C_{12}E_8$. Comparison of Panels B in Figures XIII and XV shows that the additional Mg^{2+} reduces the AMPPCP-induced fluorescence rise, in contrast with what 10 mM Ca^{2+} does. Ca^{2+} was nevertheless able to at least partially revert the effect of Mg^{2+} (compare Panels B & D in the present Figure XV)

Figure XVI. Using detergent-solubilized ATPase, a millimolar Ca^{2+} concentration together with AMPPCP again clearly slows down reaction of SH groups with DTNB.

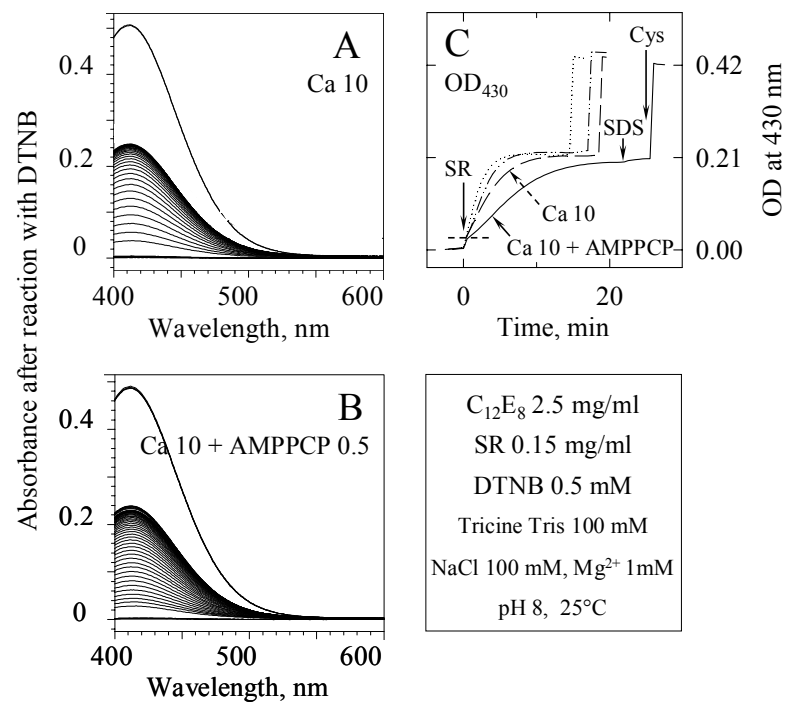


Figure XVI. Using detergent-solubilized ATPase, a millimolar Ca^{2+} concentration together with AMPPCP again clearly slows down reaction of SH groups with DTNB.

Same experiment as the one illustrated in Figure 4, except that the medium, in addition, contained 2.5 mg/ml C_{12}E_8 . Conditions for the various traces in *Panel C* are: 10 mM Ca^{2+} + AMPPCP (continuous line); 10 mM Ca^{2+} only (dashed line); 0.05 mM Ca^{2+} + AMPPCP (dash-dot-dot line); 0.05 mM Ca^{2+} only (dotted line). Reaction of DTNB with the SH groups of solubilized ATPase was faster than for membraneous ATPase in *Figure 4* and the kinetics of the rise in absorbance was slightly S-shaped, reminiscent of what was previously described in Andersen & Møller (1977), *Biochim. Biophys. Acta* **485**, 188-202.

Manuscrit # 4:

Effects of inhibitors on luminal opening of Ca^{2+} binding sites in an E2P-like complex of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase with Be^{2+} -fluoride

Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. (2005)

Accepté dans J. Biol. Chem.

Effects of inhibitors on luminal opening of Ca^{2+} binding sites in an E2P-like complex of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase with Be^{2+} -fluoride

Martin Picard[§], Chikashi Toyoshima[¶], and Philippe Champeil[§]

[§] *Unité de Recherche Associée 2096 (CNRS), Service de Biophysique des Fonctions Membranaires (CEA) and Institut Fédératif de Recherche 46 (Université Paris-Sud), Département de Biologie Joliot-Curie at CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex (France), and*

[¶] *Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032 (Japan).*

Running title : Effects of TG, BHQ and CPA on SERCA1a

Address correspondence to: Ph. Champeil, CNRS URA 2096 & SBFM/DBJC, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex (France). Tel: 33 1 6908 3731; Fax: 33 1 6908 8139; E-mail: champeil@dsvidf.cea.fr

We document here the intrinsic fluorescence and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding properties of putative “E2P-related” complexes of Ca^{2+} -free ATPase with fluoride, formed in the presence of magnesium, aluminium or beryllium. Intrinsic fluorescence measurements suggest that in the absence of inhibitors, the ATPase complex with beryllium fluoride (but not those with magnesium or aluminium fluoride) does constitute an appropriate analog of the “ADP-insensitive” phosphorylated form of Ca^{2+} -ATPase, the so-called “E2P” state. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding measurements, performed in the presence of 100 mM KCl, 5 mM Mg^{2+} and 20 % DMSO at pH 8, demonstrate that this ATPase complex with beryllium fluoride (but again not those with magnesium or aluminium fluoride) has its Ca^{2+} binding sites accessible for rapid, low-affinity (submillimolar) binding of Ca^{2+} from the luminal side of SR. In addition, we specifically demonstrate that in this E2P-like form of ATPase, the presence of thapsigargin (TG), 2,5-di-*tert*-butyl-1,4-dihydroxybenzene (BHQ) or cyclopiazonic acid (CPA) prevents $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding, i.e. presumably prevents opening of the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding sites on the SR luminal side. As crystals of E2P-related forms of ATPase have up to now been described in the presence of thapsigargin only, these results suggest that crystallizing an inhibitor-free E2P-like form of ATPase (like its complex with beryllium fluoride) would be highly desirable, to unambiguously confirm previous predictions about the exit pathway from the ATPase transmembrane Ca^{2+} binding sites to the SR luminal medium.

Sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase (SERCA1a) is an ion pump, belonging to the family of P-type ATPases and responsible in muscle cells for active transport of Ca^{2+} from the cytosol into the sarcoplasmic reticulum lumen. It takes up Ca^{2+} ions from an aqueous compartment (the cytosol) where the concentration of these ions is low, and releases them on the other side of the membrane into a compartment where the concentration of Ca^{2+} is already high. This requires that at some step during the catalytic cycle of ATP hydrolysis (which provides the required energy), the pump's affinity for Ca^{2+} changes from high affinity to low affinity, coupled with topological reorientation of the binding sites from one side to the other of the membrane. SR Ca^{2+} -ATPase is generally described to have high affinity for cytosolic Ca^{2+} in its so-called “E” or “E1” conformation, and low affinity for luminal Ca^{2+} in its phosphorylated so-called “*EP” or “E2P” conformation (e.g. *refs. 1-6 for review*).

Although high affinity binding of Ca^{2+} to the E1 state of Ca^{2+} -ATPase has been extensively documented, low affinity binding of Ca^{2+} to the ATPase E2P state has in most cases been deduced from indirect experiments only, because of the difficulties inherent to directly measuring low affinity $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to a species which, in addition, is not necessarily stable: only one attempt for such a direct measurement was described recently (*7*). Yet, for complete description of the complete transport process, availability of a robust assay for characterizing the sites of Ca^{2+} release from phosphorylated ATPase towards the SR lumen would be highly desirable.

Meanwhile, thanks to the recent crystallization of several forms of SR Ca^{2+} -ATPase, elucidation of the structural basis for ATP-driven ion pumping has made significant steps forward. Detergent-solubilized SR Ca^{2+} -ATPase has been crystallized under various forms, with the hope of understanding the structural changes occurring sequentially during its catalytic cycle (8-14). Yet, in none of these forms, including the Ca^{2+} -free fluoride forms once thought to be related to E2P, was the exit pathway from the transport sites towards the luminal medium found fully open (13-14), and only hints concerning this exit pathway could be proposed (13).

Moreover, it should be recalled that detergent-solubilized Ca^{2+} -ATPase is highly unstable in the absence of Ca^{2+} . Thus, to avoid Ca^{2+} -ATPase irreversible denaturation on the time-scale of 3D-crystallization experiments, the crystals grown in the absence of Ca^{2+} , including those for Ca^{2+} -free fluoride forms (9, 13-14), have up to now been prepared in the presence of thapsigargin (TG). Thapsigargin is a strong inhibitor of the protein activity (15-16), which binds with very high affinity to one of the functionally-relevant conformations of Ca^{2+} -ATPase, the "E2" conformation that the ATPase specifically adopts in the absence of Ca^{2+} (e.g. 17-18). In this conformation, it binds in a cleft located between transmembrane segments 3, 5 and 7 (9, 19-20) and it probably glues these segments together, resulting in ATPase protection against denaturation (21). Very recently, it was found that the presence, in addition to TG, of 2,5-di-*tert*-butyl-1,4-dihydroxybenzene (BHQ, an inhibitor of Ca^{2+} -ATPase also thought to be specific for E2), improved the quality of "E2" crystals (22). It is fair to ask whether the presence of TG or other inhibitors could have biased the conclusions derived from crystals which failed to reveal transport sites open towards the lumen.

Previous experimental results do not clearly suggest one answer or another. On the one hand, proteolysis experiments previously suggested that the presence of TG affects only little the overall ATPase conformation in its cytosolic region: for instance, the almost complete protection against proteolytic cleavage afforded by binding of vanadate or metal-fluoride complexes to the ATPase was observed to occur both in the presence and absence of TG (23). Vanadate and fluoride are both thought to allow formation of complexes that are more or less

closely related analogs of the ADP-insensitive phosphorylated state of the enzyme, or of the transition state for dephosphorylation: they are here dubbed "E2P-related" states, in a loose sense. TG did not affect much either the superfluorescent state of TNP-AMP bound to the ATPase complex with beryllium fluoride (24). On the other hand, it was previously shown that TG altered the affinity of Ca^{2+} -free ATPase for ATP (16), and it was suggested that the interaction of ATPase with thapsigargin (or BHQ) might result in formation of modified E2 species (25-27). More specifically, TG was also shown to induce pretty large structural changes in 2D-crystals of the E2P-related E2.Vanadate form (28); and TG was suspected from Trp fluorescence experiments (but with no direct evidence) to close, in E2P-related states, the postulated Ca^{2+} release pathway from the ATPase sites towards the SR lumen (24).

Relevant to these issues, it should also be mentioned the so-called "E2P-related" complexes of Ca^{2+} -free ATPase with fluoride described so far did not all appear to be equally close to the "true" E2P form: all fluoride forms tested were inactive, but reactivation by exposure to a high luminal Ca^{2+} concentration was faster for the ATPase complex with beryllium fluoride than for those with aluminium fluoride or magnesium fluoride. Thus, the ATPase complex with beryllium fluoride was suggested to have its transport sites most widely open to luminal Ca^{2+} (24). But again, in the absence of direct $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding measurements, it is not possible to exclude that faster reactivation was due to reduced stability of the ATPase.fluoride complex in the presence of beryllium, compared with the two other metal ions.

Here, to address these questions, critical ones indeed for the sensible interpretation of presently available or future X-ray structures of Ca^{2+} -free ATPase forms, we establish a robust assay of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to the luminal sites of Ca^{2+} -ATPase forms where these sites show up, which gives results somewhat different from those previously reported in Vieyra et al. (7). Simultaneously, we study the effect of TG and other inhibitors on this binding. The properties of Ca^{2+} -free ATPase.fluoride complexes formed in the presence of magnesium, aluminium or beryllium, and in the absence or presence of TG or other inhibitors (namely BHQ or cyclopiazonic acid (CPA)), are documented here. Intrinsic fluorescence measurements and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding measurements both demonstrate that in

the absence of inhibitors, the ATPase complex with beryllium fluoride (but not that with magnesium or aluminium fluoride) constitutes an appropriate analog of the E2P state of Ca^{2+} -ATPase, with its Ca^{2+} binding sites readily accessible from the SR lumen. In addition, we specifically demonstrate that in this E2P-like form of ATPase, the presence of TG, BHQ or CPA prevents binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$, i.e. presumably prevents opening of the lumenally-oriented $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding sites.

As an unfortunate result of our study, there is therefore little hope that crystals grown in the presence of any of these inhibitors could reveal in an open form the pathway of Ca^{2+} ions from their binding sites (within the bundle of ATPase transmembrane segments) towards the SR lumen (where these ions are released as a result of their transport). On the more positive side, our results establish a new tool for monitoring low affinity binding of Ca^{2+} to the lumenally-oriented low-affinity sites of E2P-like forms of Ca^{2+} -ATPase. They simultaneously suggest that crystallizing an inhibitor-free E2.BeF_x complex would indeed be of utmost interest, to confirm previous predictions about the Ca^{2+} internalization pathway from its transmembrane binding sites in Ca^{2+} -ATPase toward the SR luminal medium (13).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Membrane preparation and stock solutions for chemicals. Sarcoplasmic reticulum (SR) membrane vesicles were prepared from rabbits as previously described (29), after 2-days fasting of the animals and inclusion of 1 µg/ml of α-amylase in the initial homogenization buffer (to avoid SR contamination with muscle phosphorylase, see e.g. ref. 30). Potassium fluoride (stock solution was 1M in water) was from ICN (# 156339), TG (stock solution was 1 mg/ml in DMSO, i.e. about 1.5 mM) was from Calbiochem (# 586005), CPA (stock solution was 10 mg/ml in DMSO, i.e. about 30 mM) was from Sigma (# C1530), BHQ (stock solution was 22 mg/ml in DMSO, i.e. 100 mM) was from Aldrich (# 11,297-6), BeCl_2 (stock solution was 991 µg/ml in 1 % HCl, i.e. about 110 mM in about 300 mM HCl) was from Aldrich (# 20,698-9), and AlCl_3 (stock solution was 100 mM) was from Sigma (# A-3017). Proteinase K (stock suspension was at 1.5 mg/ml) was from Boehringer (# 745723).

Formation of ATPase:fluoride complexes.

Reaction of ATPase with fluoride in the presence of various metals was performed in buffer A (100 mM KCl, 5 mM Mg^{2+} and 50 mM Mops-Tris at pH 7 and 20°C) supplemented with 250 µM EGTA, in the absence of DMSO for Trp fluorescence measurements or in the presence of 20 % DMSO (v/v) for $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding measurements; 1 mM KF was added, either alone (i.e. simply with Mg^{2+}) or together with 50 µM BeCl_2 or 50 µM AlCl_3 (and Mg^{2+} , present from the start). When Trp fluorescence was to be measured after addition of fluoride, SR was present at 0.1 mg protein/ml from the start; when $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding was to be measured after preincubation, SR was generally added to the complete fluoride-containing reaction medium, at either 0.3 or 3 mg protein/ml. To measure residual ATPase activity, aliquots were taken after preincubation for various periods, and diluted into a standard ATPase assay medium containing 0.5 mg/ml C_{12}E_8 .

Intrinsic fluorescence measurements.

Sarcoplasmic reticulum (SR) membrane vesicles were suspended at 0.1 mg/ml in the thermostatted and continuously stirred cuvette of a SPEX Fluorolog fluorometer (e.g. ref. 31), and Trp fluorescence was monitored using an excitation wavelength of 295 nm and an emission wavelength of either 315, 330 or 355 nm. Bandwidths were 2 and 10 nm, respectively.

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding measurements. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to Ca^{2+} -ATPase was measured as previously described (32), using nitrocellulose Millipore filters to adsorb the ATPase membranes and including [^3H]-glucose in the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -containing buffer to serve as a marker of the amount of fluid trapped in the filter (and therefore of the amount of non-bound $^{45}\text{Ca}^{2+}$, trapped in the filter together with bound $^{45}\text{Ca}^{2+}$). The buffer for $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding generally contained 100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 100 mM Tes-Tris (at pH 8 and 20°C), 20 % (v/v) DMSO, [^3H]-glucose and $^{45}\text{Ca}^{2+}$, as well as, in some cases, a small concentration of residual EGTA from the preincubation medium (for instance, in Figure 4 experiments, 225 µM total $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and 25 µM residual EGTA, i.e. a free Ca^{2+} concentration of 200 µM). Tricine was avoided as a buffer, because Tricine binds Ca^{2+} with a significant affinity under our conditions (data not shown; see also ref. 33). Note that “non-specific” sites (with respect to Ca^{2+} -ATPase), including those inside the SR compartment if the vesicles

are made leaky (e.g. calsequestrin), also contribute to the measured amount of bound $^{45}\text{Ca}^{2+}$, especially at pH 8; this was minimized by working at 5 mM MgCl_2 and in the presence of 100 mM KCl. Experiments in which 0.3 or 0.6 mg SR protein was to be retained by the filter were performed with Millipore HA or GS filters, respectively. In the latter case, the smaller pore diameter (0.22 μm instead of 0.45 μm) results in a larger surface available for adsorption of SR membranes. Filters were not rinsed, and they were counted for both ^3H and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ radioactivity.

RESULTS

Background

As already mentioned under Introduction, one of the ATPase intermediate forms during its catalytic cycle must have its Ca^{2+} binding sites opened towards the luminal side and simultaneously endowed with poor affinity for Ca^{2+} , to permit Ca^{2+} release into an SR lumen already containing a high concentration of free Ca^{2+} (and therefore active transport of Ca^{2+}). This ATPase form is usually described as the ATPase “E2P” form, and a major aim of the present work was to measure binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to such a form.

A first prerequisite for such measurement is availability of a membrane preparation in which the SR luminal side is made accessible to $^{45}\text{Ca}^{2+}$ added to the outer medium. For this purpose, we used a Ca^{2+} ionophore (calcymycin, A23187) in most of our experiments (but not in all of them, to make it possible to discriminate between binding sites accessible from the cytosolic side and binding sites accessible from the luminal side).

A second prerequisite is availability of a tool allowing discrimination between binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to specific sites on the ATPase and “non-specific” binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to other sites in the SR preparation. We chose to perform experiments in the absence or presence of thapsigargin (TG), as TG is known, at least as concerns Ca^{2+} binding to an ATPase initially in the E2 form, to block or dramatically slow down Ca^{2+} binding to the ATPase high affinity cytosolic sites (15-18, 25).

Thirdly, demonstrating Ca^{2+} binding to E2P is made difficult both by the transient nature of the E2P form and by its above-mentioned poor affinity for Ca^{2+} . Thus, we chose to increase the stability of the E2P form by including DMSO in the solution (34), and to increase its affinity for Ca^{2+} by making the pH in the solution more alkaline (35). A recent report already made use of

such conditions to try and measure the binding of Ca^{2+} to E2P (7). In our hands, however, even such conditions were not sufficient to make the experiments reliable, especially in the presence of TG (see below).

Thus, in addition to the above general conditions, but instead of using a genuine E2P form, we chose to use more stable ATPase forms, namely ATPase complexes with fluoride, which are thought to be potential E2P analogs and which can be formed in the absence of Ca^{2+} but presence of various other metals: either magnesium alone, or, in addition, aluminium or beryllium (these complexes will be referred to below as E2. MgF_4 , E2. AlF_4 and E2. BeF_x).

A few properties of these complexes have already been described, and two of them (E2. MgF_4 , E2. AlF_4) have in fact already been crystallized (36-40, 24, 13-14). According to previous indirect evidence, it is in the fluoride complex formed in the presence of beryllium, E2. BeF_x , that the ATPase conformation is most similar to that of the E2P form and that its Ca^{2+} sites are most accessible from the luminal medium, as judged, in particular, from the highest efficiency of luminal Ca^{2+} for reversing the inhibition of this particular complex (24).

Trp fluorescence properties of complexes of Ca^{2+} -free ATPase with fluoride (especially E2. BeF_x), in the absence or presence of TG or BHQ.

To start with, the conformational properties of the various ATPase complexes with fluoride were examined with intrinsic fluorescence. It had been shown previously that the drop in intrinsic fluorescence typically observed upon binding of TG to Ca^{2+} -free ATPase (17) was significantly larger for E2P or the E2. BeF_x forms than for either E2 or the other ATPase-fluoride forms (24). Here, this point was investigated further.

Panel A in Figure 1 first confirms the finding in ref. 38 that addition of fluoroaluminate to Ca^{2+} -free ATPase, leading to formation of an E2. AlF_4 species, only induces a slow decrease in the overall fluorescence intensity of the ATPase, and the finding in ref. 24 that subsequent addition of TG quenches the fluorescence of this species only moderately, as initially described for E2 (17). Panel B also confirms that the same addition of TG to E2. BeF_x induces a much larger fluorescence decrease, as previously described (24).

But in addition, *Panel B* in *Figure 1* reveals that formation of $E2.BeF_x$ itself results in significant Trp fluorescence enhancement, at a rate consistent with the rate of inhibition of ATPase under identical conditions (half-time of about 2 minutes in the absence of DMSO, data not shown). After formation of this $E2.BeF_x$ complex, ATPase fluorescence was no longer sensitive to addition of cytosolic Ca^{2+} , as expected (see *Panel B* of *Figure S1* in *Supplemental Material*). The fact that beryllium fluoride enhances ATPase fluorescence in the absence of Ca^{2+} contrasts with the fact that in the presence of Ca^{2+} and ADP, no such rise is detectable (see *Panel D* of *Figure S1* in *Supplemental Material*), again despite the fact that aluminium fluoride, as previously described (31), now triggers formation of an $E1.ADP.AlF_x$ form of high fluorescence (*Panel C* of *Figure S1* in *Supplemental Material*). The rise in fluorescence observed upon formation of $E2.BeF_x$ (*Panel B* of *Figure 1*) was only observed in the presence of Mg^{2+} (data not shown), as expected from the Mg^{2+} -dependence of ATPase inhibition in the presence of beryllium and fluoride (37 and data not shown). Note that a rise in ATPase intrinsic fluorescence is also observed upon formation of the E2P (41, 29).

Remarkably enough, this rise in Trp fluorescence was converted into a fluorescence drop in the presence of A23187 (calcimycin), used as an hydrophobic fluorescence quencher (*Panel D* in *Figure 1*), while the large drop observed upon addition of TG was wiped off. The drop in Trp fluorescence observed in the presence of A23187 upon formation of the $E2.BeF_x$ complex is reminiscent of the fact that a drop in the presence of A23187 or other hydrophobic quenchers was also observed upon formation of the genuine E2P phosphoenzyme (42-43). Thus, both in the absence and presence of quencher, these fluorescence results support the previous claim by Danko et al. (24) that the $E2.BeF_x$ complex (but not the $E2.AlF_4$ complex) is a fair analog of genuine E2P.

We also tried to add beryllium fluoride to Ca^{2+} -free ATPase previously cleaved at $T^{242}-E^{243}$ by proteinase K, under conditions resulting in a fairly homogeneous “p28N/p83C” complex which is no longer phosphorylatable by Pi although it remains phosphorylatable by ATP (44). Fluorescence experiments with such a p28N/p83C complex showed that the cleaved ATPase was not able to form a high fluorescence $E2.BeF_x$ complex, although it did form the

$Ca_2.E1.ADP.AlF_x$ complex (data not shown). This again supports close resemblance between $E2.BeF_x$ and genuine E2P.

Interestingly, a second inhibitor, BHQ, also thought to react specifically with E2 forms of Ca^{2+} -ATPase, behaves like TG as regards its effect on ATPase intrinsic fluorescence (*Figure 2*). BHQ has already been shown to quench the fluorescence of the E2 form of ATPase moderately (27). We found that, as for TG, this quenching is larger for BHQ binding to $E2.BeF_x$ than for its binding to $E2.AlF_4$ (with binding to E2 being intermediate), and only minimal after addition of BHQ to E1 forms (*Figure S2* in *Supplemental Material*). Moreover, both for BHQ and for TG, this quenching depends on the wavelength used for observing fluorescence, being largest at shortest emission wavelengths (*Figure 2*).

It was already known that going to the blue edge of Trp fluorescence (315 nm) increases the amplitude of the fluorescence rise induced by Mg^{2+} addition, while going to the red edge (355 nm) results in a signal of opposite sign for Mg^{2+} (45), and this was confirmed here. As a corollary, we found that the $E2.BeF_x$ signal itself is even more prominent at 355 nm (*Figure 2*, *Panels C&F*). These data therefore provide spectroscopic characterization of those Trp residues which respond to $E2.BeF_x$ formation or TG binding. In contrast, parallel experiments did not reveal any clear dependence on observation wavelength of the signal associated with formation of the $Ca_2.E1.ADP.AlF_x$ complex (data not shown).

Measurement of rapid binding of $^{45}Ca^{2+}$ to $E2.BeF_x$, an E2P-like form of Ca^{2+} -ATPase.

We then performed $^{45}Ca^{2+}$ binding experiments (*Figure 3*, *Panel A*). For these experiments, Ca^{2+} -free SR vesicles made leaky by ionophore A23187 were preincubated with fluoride and beryllium (here in the presence of 20 % DMSO), leading to formation of the $E2.BeF_x$ species (and inhibition of ATPase activity, e.g. *Figure S3* in *Supplemental Material*). Control vesicles were prepared similarly but in the absence of beryllium fluoride (i.e. in the E2 form). Then, preincubated samples were loaded onto a nitrocellulose filter and immediately perfused for various periods manually, with a $^{45}Ca^{2+}$ -containing binding buffer at pH 8 and in the continued presence of 20 % DMSO. The final free $^{45}Ca^{2+}$ concentration in the perfusion buffer was 200 μM , to render possible

detection of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding with relatively poor affinity. Filters were counted without washing. In some cases preincubated samples had been supplemented with TG immediately before loading onto the filter and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ perfusion.

Starting with measurements performed with ATPase initially in the E2 form (circles), *Figure 3A* shows that the presence of TG together with E2 reduced the amount of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ found on the filter by about 10 nmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /mg protein, from 18-19 nmol/mg in the absence of TG (open circles) to 8-9 nmol/mg in its presence (closed circles). As TG prevents rapid $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to ATPase in the E2 state (*Sagara et al., 1992a*), this difference, i.e. the TG-sensitive fraction of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding, 10 nmol/mg, is to be attributed to $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to the ATPase, and this is indeed the level expected for binding with a stoichiometry of 2 binding sites per ATPase monomer (e.g. 46, 32). Open circles were labelled "E2" in *Panel A* because the ATPase initially was in its E2 form; but in this case the ATPase of course adopts its $\text{Ca}_2\text{E1}$ state after Ca^{2+} binding, with Ca^{2+} bound to the classical high affinity sites on the ATPase cytosolic side.

The residual 8-9 nmol/mg $^{45}\text{Ca}^{2+}$ bound in the presence of TG (closed circles in *Figure 1A*) must be attributed to binding to other sites, "non-specific" with respect to Ca^{2+} -ATPase, probably mostly (see below) Ca^{2+} binding sites inside the SR lumen, like calsequestrin, made accessible by the presence of ionophore (note that under these conditions, binding to ionophore itself is hardly detectable), or perhaps sites on the external surface of the vesicles which can bind Ca^{2+} at the alkaline pH used here (pH 8). This residual binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to permeabilized SR vesicles with ATPase in its E2.TG state was relatively fast, confirming that the added ionophore allows fast access to the SR lumen. This fast binding also fits with what can be expected for binding to sites of poor affinity. As it has been suggested that TG does not fully block Ca^{2+} binding to Ca^{2+} -ATPase but only reduces the ATPase affinity for Ca^{2+} (18, 25), it might be argued that part of the bound $^{45}\text{Ca}^{2+}$ measured in the presence of TG might reside on the Ca^{2+} -ATPase. However, the dramatic slowing down, over minutes, of the kinetics of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding in the presence of TG simultaneously reported by the same authors (18, 25) makes that alternative interpretation of our results unlikely, as in our experiments $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding in the presence of TG was already complete after 2-3 seconds (more also below).

In the absence of TG, binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to ATPase initially in its E2. BeF_x state (open triangles in *Figure 3A*) was lower than binding to E2 (open circles), but quite significant. This reduced binding is consistent with low affinity binding to E2. BeF_x (see below). *Per se*, it also proves that binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ did not kick beryllium and fluoride out of the ATPase catalytic site within the time period (60 seconds) of these relatively rapid binding measurements, despite the fact that perfusion washed away fluoride or beryllium from the filter. This binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to E2. BeF_x was completed within a few seconds, too, which again fits with what can be expected for binding to sites of poor affinity, but disagrees with the putative very slow binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to E2P recently suggested in *ref. 7*.

Importantly, in the presence of TG, binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to ATPase initially in its (E2. BeF_x +TG) state (closed triangles in *Figure 3A*) dropped to the same low level as when ATPase was in its E2.TG state. This shows that the low affinity Ca^{2+} binding sites present in E2. BeF_x are no longer available in the presence of TG (see also subsequent Figures below).

Panel B in *Figure 3* shows an experiment similar to that in *Panel A*, except that SR vesicles had now been preincubated (under the same conditions) either with 1 or 3 mM inorganic phosphate (open or dotted circles, respectively), leading to very significant ATPase phosphorylation to E2P (as checked in standard phosphorylation assays with $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$, data not shown), or with 1 mM vanadate, leading to formation of E2-oV and E2-dV states (ortho- or decavanadate, open or dotted upside-down triangles, respectively). Binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to the initially-E2.VO4 forms was time-dependent over this 60 seconds period of time, which we interpret as revealing Ca^{2+} -induced destabilization of E2.VO4 forms within this period: this was confirmed by measuring the rate of Ca^{2+} induced recovery from ATPase inhibition under similar conditions (*Figure S4* in *Supplemental Material*).

Binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to ATPase initially in its E2P form (squares in *Figure 3B*) almost immediately reached the same level as the one found after binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to E2 (circles in *Panel A*); however, classical dephosphorylation assays (not shown) showed that this was mainly due to the fact that 20 % DMSO (in the presence of 100 mM KCl) does not slow down E2P dephosphorylation sufficiently. Thus, under our experimental conditions, only the E2. BeF_x form

(Figure 3A) was stable enough to make analysis of the low affinity $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding curves significant.

Luminal binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to E2.BeF_x and lack of binding to other E2.fluoride forms.

To discriminate between binding sites accessible from the cytosolic side and binding sites accessible from the luminal side, we repeated similar measurements in the absence or presence of the Ca^{2+} ionophore A23187 (Figure 4). These experiments were performed over a moderately longer time scale (up to 4 minutes) and with a slightly different protocol, to see how robust the previous results were. Here, *intact* SR vesicles, therefore mostly tight (see however below), were first incubated (at a protein concentration tenfold larger than previously) either in the absence of fluoride (Panels A&D), or in its presence together with magnesium and beryllium (Panels B&E) or together with magnesium alone (Panels C&F); they were subsequently diluted tenfold into a [^3H]sucrose- and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -containing medium, and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding was allowed to occur during various periods of incubation. Some of these samples had been supplemented with ionophore and/or TG immediately before dilution into the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding medium. Only after dilution and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding were the samples loaded onto nitrocellulose filters, for subsequent double radioactivity counting of the filter without washing. The final free $^{45}\text{Ca}^{2+}$ concentration during $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding (after dilution) was kept at 200 μM , taking into account the residual EGTA from the preincubation medium.

Panels A-C in Figure 4 first shows results obtained with this new protocol when vesicles had been made leaky with ionophore, as previously: results identical to the previous ones were obtained for ATPase initially in its E2 state (Panel A) or in its E2.BeF_x state (Panel B). In the absence of TG, a lower amount of bound $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was again found for ATPase initially in the E2.BeF_x state (open triangles in Panel B) than for ATPase initially in the E2 state (open circles in Panel A), whereas in the presence of TG the amount found was again similar in both cases (closed symbols in Panels A&B). The TG-sensitive fraction of bound $^{45}\text{Ca}^{2+}$, although not very large, was definitely significant considering the range of possible errors in the various subtractions (data corresponding to three independent experiments all fall on the same line, as will be shown below in Figure 6). The very

fact that $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to E2.BeF_x remained fairly stable again ensures that Ca^{2+} -dependent destabilization of this fluoride form was not too much of a concern in these experiments over a few minutes at 200 μM free Ca^{2+} (see below further discussion of the effect of Ca^{2+} concentration on this destabilization).

When similar experiments in the presence of ionophore were repeated with ATPase initially in the E2.MgF₄ state (Panel C), the measured amount of bound $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was found to be only hardly larger in the absence of TG than in its presence (open and closed diamonds in Panel C, respectively). TG-resistant $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding was identical to that in Panels A&B, considered to represent binding to non-ATPase sites. These results are nicely consistent with the previous suggestion that luminal Ca^{2+} sites are much less accessible in E2.MgF₄ than in E2.BeF_x (Danko et al., 2004), and in fact they *prove* that the much slower recovery from inhibition observed in that paper for E2.MgF₄ (compared with E2.BeF_x) was *not* due to greater stability of this complex with fluoride, but was indeed due to poorer exposure of its Ca^{2+} binding sites.

Panels D-F in Figure 4 then show results obtained in the *absence of ionophore*. In the presence of TG (closed symbols), $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding was in all cases much lower than in the presence of ionophore, supporting the previous interpretation that TG-resistant binding to SR vesicles represents $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to sites *different* from those on Ca^{2+} -ATPase and residing mainly *inside* the SR lumen. In the absence of TG, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to ATPase initially in its E2 state was again about 10 nmol/mg higher than in the presence of TG (compare open and closed circles in Panel D), and this difference, the TG-sensitive fraction of bound $^{45}\text{Ca}^{2+}$, again represents the amount of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ rapidly and specifically bound to the cytosolically-accessible high-affinity Ca^{2+} binding sites on the ATPase (32). $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to ATPase initially in its E2.MgF₄ state was again hardly different from that in the presence of TG (Panel F). But the TG-sensitive fraction of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ bound to E2.BeF_x (*i.e.* the difference between open and closed triangles) was definitely *smaller* in the absence of ionophore (Panel E) than in its presence (Panel B), demonstrating that Ca^{2+} binds to sites on E2.BeF_x mostly from the luminal side, as previously suggested.

It is fair to recognize that this TG-sensitive fraction of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ bound to E2.BeF_x, although smaller in the absence of ionophore than

in its presence, was not exactly zero in the absence of ionophore (*Panel E*). Similarly, Ca^{2+} was previously found to partially stimulate ATPase recovery in the absence of ionophore (24). These somewhat puzzling observations do not ruin the above claim of a luminal orientation for the Ca^{2+} binding sites in E2.BeF_x . We think they simply reflect the presence, in most SR vesicle preparations (including ours) of a fraction of vesicles that are *not* completely tight, for instance because of imperfect SR resealing during muscle homogenization (or after freezing and thawing), or because of partial denaturation of a few ATPases (opening leaks in the membrane, see e.g. *ref. 47*). In fact, in the old days, *selecting the subpopulation* of vesicles that were completely tight and therefore could be actively loaded with Ca^{2+} has been the purpose of a number of attempts (e.g. *ref. 48*).

Note that the amount of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ bound in the absence of ionophore to SR vesicles with ATPase initially in its E2 state slowly rose with time (over minutes), and this was the case both in the absence or presence of TG (open and closed circles in *Panel D*), and also to some extent for fluoride complexes (*Panels E&F*). This slow rise most probably represents slow passive $^{45}\text{Ca}^{2+}$ entry into the lumen of the tight vesicles (*Orlowski et al., 1991*). Conversely, the presence of a subpopulation of SR vesicles that are *not* tight accounts for part of the extrapolation to zero time of the amount of bound $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in the presence of TG and absence of ionophore (closed circles in *Figure 4D*). This excludes further the hypothesis, alluded to above, that TG-resistant binding could represent binding to TG-inhibited ATPase. The similar levels found after preincubation with or without fluoride also exclude it (closed symbols in *Panels A-C or D-F of Figure 4*).

Related measurements with E2.AIF_4 will be shown below.

Submillimolar affinity for $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to E2.BeF_x and Ca^{2+} -induced destabilization.

The reduced binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to E2.BeF_x compared to E2 (in Figs 3 & 4) was interpreted above as implying poorer affinity for Ca^{2+} of the luminal binding sites in E2.BeF_x , compared to the cytosolic ones in E2. This is because of the result of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding experiments similar to those shown in *Figure 4* but which were performed at a *lower* free Ca^{2+} concentration, 100 μM instead of 200 μM (*Figure 5*): in those experiments, while TG-

resistant $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to leaky SR vesicles was reduced to about 5 nmol/mg (closed symbols in *Panels A-C of Figure 5*), the TG-sensitive fraction of (cytosolic) binding to E2 remained 9-10 nmol/mg (difference between open and closed circles in *Panel A of Figure 5*), but the TG-sensitive fraction of (luminal) binding to E2.BeF_x dropped to about 3 nmol/mg at 100 μM free Ca^{2+} (difference between open and closed triangles in *Panel B of Figure 5*), compared to 4-5 nmol/mg at 200 μM free Ca^{2+} (*Figures 4B & 3A*). The affinity for Ca^{2+} of the lumenally-oriented sites in E2.BeF_x therefore appears to be of the order of 150-200 μM . Note that in this series of experiments, we included an ATPase sample prepared as the E2.AIF_4 state: we found (*Panel C of Figure 5*) that $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to that state (in the presence of ionophore) was much lower than binding to E2.BeF_x , again demonstrating directly the previous suggestion that luminal binding sites are also much less accessible to Ca^{2+} in the transition-state analog E2.AIF_4 than in the E2P -like E2.BeF_x (24).

Conversely, measuring binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to the luminal sites of E2.BeF_x at free Ca^{2+} concentrations *higher* than 200 μM would be desirable to confirm the stoichiometry of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding; however, this would be made very difficult by signal-over-noise problems, resulting from both the increased amount of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ trapped in the wetting volume of the filter (which has to be subtracted) and the increased non-specific binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to SR internal sites (corresponding to the closed symbols in *Figure 4 D-F*). Thus, the free Ca^{2+} concentration of 200 μM chosen for the experiments illustrated in *Figures 3 & 4* was a fair compromise. In addition, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding experiments performed at higher free Ca^{2+} concentrations would probably suffer from significant Ca^{2+} -induced destabilization of the E2.BeF_x state, as now discussed.

Indeed, the latter prediction was confirmed by ATPase activity measurements, similar to those in *ref. 24* and designed to more precisely evaluate under our own exact conditions the rate of this destabilization. Interpolation of measurements, performed at two different Ca^{2+} concentrations (100 μM and 1 mM), of the Ca^{2+} -induced recovery of E2.BeF_x from activity inhibition (*Figure S4 in Supplemental Material*), showed that under our experimental conditions over a few minutes, as in *Figure 4B*, destabilization by 200 μM Ca^{2+} probably affects less than 10-20 % of the ATPase

E2.BeF_x complexes, whereas going to 1 mM Ca²⁺ would result in marked (possibly cooperative) destabilization over the same period. *Figure S4 in Supplemental Material, Panels D-F*, also shows that the presence of 20 % DMSO in our ⁴⁵Ca²⁺ binding buffer was essential for making E2.BeF_x sufficiently stable in these activity recovery experiments, and therefore also in our ⁴⁵Ca²⁺ binding experiments at 100 or 200 μM free Ca²⁺.

Even at 100 or 200 μM, there is, in fact, a slight upward drift, over minutes, in the curves for ⁴⁵Ca²⁺ binding to E2.BeF_x. This can be made even more apparent in longer-term ⁴⁵Ca²⁺ binding experiments. For instance, at 200 μM Ca²⁺, experiments similar to those in *Figure 4* were conducted over up to half-an-hour, and did show a significant time-dependent rise at the end of this period. This is shown in *Figure S5 in Supplemental Material*.

Note that the latter experiment was performed with spontaneously-leaky membranes of deoxycholate-purified ATPase (kindly provided by Pr J.V. Møller) instead of SR vesicles made leaky with ionophore: the smaller amount of calsequestrin in these purified ATPase membranes results in a lower level of TG-resistant ⁴⁵Ca²⁺ binding, but a similar level of TG-sensitive ⁴⁵Ca²⁺ binding to E2.BeF_x over the first minutes, compared with calsequestrin-containing SR made leaky with ionophore (*Figure S5 in Supplemental Material*), also consistent with the above interpretation of our data.

BHQ and CPA, too, inhibit the luminal binding of ⁴⁵Ca²⁺ to E2.BeF_x.

Lastly, additional experiments were performed to test for the effect, on luminal ⁴⁵Ca²⁺ binding to E2.BeF_x, of additional inhibitors of Ca²⁺-ATPase previously also described to interact with the E2 form: 2,5-di-*tert*-butyl-1,4-dihydroxybenzene (BHQ) and cyclopiazonic acid (CPA). E2 and E2.BeF_x forms were again prepared, ionophore was again added, and aliquots were then supplemented with either TG as above, or CPA, or BHQ. *Figure 6* makes clear that, just like with TG, ATPase preincubation with CPA (upside-down open triangles) inhibited both the (cytosolic) binding of ⁴⁵Ca²⁺ to the E2 form (*Panel A*), as well known, and the (luminal) binding of ⁴⁵Ca²⁺ to the E2BeF_x form (*Panel B*). BHQ (squares) also did so; however, under our conditions, BHQ appeared to bind with poorer affinity than TG or CPA, as a larger molar excess of BHQ over ATPase was required for almost

complete inhibition (closed versus open squares). The poor apparent affinity with which BHQ binds to the ATPase under our conditions probably is an unfavourable consequence of the presence of DMSO in our buffers (*D. McIntosh, personal communication*).

DISCUSSION

Opening of the ATPase Ca²⁺ transport sites towards the luminal side of SR.

In crystals of Ca²⁺-ATPase (SERCA1a) containing bound Ca²⁺ ions, the binding sites for Ca²⁺ located in the transmembrane section of SERCA1a are found shielded from the aqueous medium (*8, 11-12*). Based on functional measurements, Ca²⁺ ions had previously also been described as being “occluded” in some conformations of the Ca²⁺ pump, for instance in the so-called E1P state of ATPase (e.g. *ref. 49* for review). However, to make active transport of Ca²⁺ possible, these binding sites for Ca²⁺ must of course transiently open, first towards the cytosolic medium, to take up Ca²⁺ with high affinity (a binding generally described to be associated with the so-called E1 form of ATPase), and then toward the luminal side of the membrane, after experiencing simultaneously transition to a state where they have lost most of their affinity for Ca²⁺, so that Ca²⁺ can be released into the SR lumen (a release generally described to be associated with the so-called E2P form of ATPase). Previous studies have dubbed “E2P” the putative state in which the Ca²⁺-ATPase, after phosphorylation, has its transport sites accessible from the luminal side. In this state, a high Ca²⁺ on the luminal side of SR vesicles has been found to promote backwards functioning of the ATPase cycle in the direction of ATP synthesis (e.g. *1, 35*). A high luminal Ca²⁺ has also been found to promote destabilization of putative E2P-like intermediates, formed in the absence of Ca²⁺ from either vanadate or fluoride (in the latter case, in the presence of various metals) (*e.g. 50-51, 24*). We have attempted here to directly reveal these lumenally-oriented binding sites.

⁴⁵Ca²⁺ binds from the luminal side to SR Ca²⁺-ATPase in its E2.BeF_x form.

In the present work we were able to reveal these lumenally-oriented sites in a stable ATPase complex with fluoride formed in the presence of beryllium, the “E2.BeF_x” form. On the basis of indirect measurements, this form had

previously been suggested to be the ATPase-fluoride form in which Ca^{2+} binding sites were the most accessible to luminal Ca^{2+} . Our Trp fluorescence results confirm its resemblance with the genuine E2P form. They also provide spectroscopic characterization for it (although alternative explanations for some of the observed changes in fluorescence are conceivable, in line with previous results: see further discussion in *Supplemental Material and refs. 50, 52*). In addition, we were able to demonstrate the remarkable previous suggestion that Ca^{2+} sites in the E2.Bef_x form are readily accessible to luminal Ca^{2+} , by directly measuring rapid $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to these sites. Conversely, we found that $^{45}\text{Ca}^{2+}$ does not bind well to other ATPase-fluoride complexes, either E2.AlF₄ or E2.MgF₄, and these results again are the proof of the previous suggestion that opening of the Ca^{2+} sites in these forms is restricted (24). As concerns other ATPase forms, like E2.VO₄ or genuine E2P, it was nevertheless difficult under our experimental conditions (20 % DMSO and 100 mM KCl at pH 8) to obtain clearcut evidence for (or against) luminal binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to these forms, because of their insufficient stability (see further discussion in *Supplemental Material, Figure S4*).

Compared to the previously reported attempt to measure $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to a genuine E2P form (7), a remarkable feature of our results is that luminal binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to E2Bef_x was fast on a time scale of seconds (*Figure 3*), which contrasts with the slow (tens of minutes) rate of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to E2P suggested by that previous report (see further discussion in *Supplemental Material*). For binding to a low affinity site, however, our fast rate of binding sounds perfectly reasonable. Nevertheless, deciding whether the luminal sites in E2Bef_x remain open permanently, or whether they flicker from closed states to open states but spend a significant fraction of their time open, cannot be deduced from the present data (even if the latter view sounds the most likely, based on general principles of protein dynamics).

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to its luminal sites induces time-delayed destabilization of the E2.fluoride complex.

The fact that binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to these luminal sites was completed within a few seconds (*Fig 3*), whereas Ca^{2+} -dependent recovery from inhibition occurred on a much longer time scale (*Fig S4 in Supplemental Material*), has

mechanistic implications. Firstly, they bear on the long debate (*e.g. ref. 53*) about whether the species previously dubbed “E2P.Ca₂” may exist. We show that at least as concerns the fluoride complex E2.Bef_x, a complex of Ca^{2+} with an E2P-like form does exist, resulting from fast, low affinity binding of Ca^{2+} from the luminal side. Secondly, this fast binding of Ca^{2+} to E2.Bef_x reveals that for Ca^{2+} -induced destabilization of the fluoride complex, Ca^{2+} must of course bind, but binding *per se* is not rate-limiting for Ca^{2+} -dependent recovery from inhibition. The rate-limiting step for recovery from inhibition from fluoride is much slower than Ca^{2+} binding. Incidentally, this is why, in contrast with direct $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding measurements, the observation of a slow rate of recovery for E2.MgF₄ or E2.AlF₄, as in *ref. 24*, may suggest but does not strictly prove accessibility or non-accessibility of the binding sites (we had a similar difficulty in interpreting the experiments with E2.VO₄ forms).

Presumably, Ca^{2+} -induced destabilization of the E2.fluoride complex will take place because fast binding of luminal Ca^{2+} will affect the transmembrane helices harbouring the Ca^{2+} -liganding residues, this strain will be transmitted to the catalytic site (through a transition inverse of the so-called E1P to E2P transition, whereby phosphorylation at the catalytic site somehow triggers rotation of the A domain and reorganization of the Ca^{2+} binding transmembrane segments), and the beryllium/fluoride complex bound at the catalytic site will now have a chance to dissociate, on a different time scale though.

TG and other inhibitors block accessibility of the binding sites to the luminal medium.

Back to the E2.Bef_x form, in addition to making it possible to clearly reveal binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to the luminal side of ATPase, our use of this very stable form as a mimic of the normal E2P ATPase form provided us with an additional advantage: it allowed us to demonstrate the effect of TG and other inhibitors on accessibility of the binding sites to the luminal medium. In this respect, measuring $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to E2P in the presence of TG would not be as easy, because addition of TG has been shown to reduce significantly the amount of phosphoenzyme present (54, 21), and this may occur relatively rapidly, as judged from dephosphorylation measurements under our conditions (data not shown). In contrast, the stability of the

ATPase-fluoride forms is sufficient to allow TG binding to occur without promoting a concomitant chase of the fluoride ligand. This is demonstrated, for instance, by the fact that although the ATPase in its E2 form is susceptible to mild proteolysis by either proteinase K (at Lys¹²⁰) or trypsin (at T2 site) in the absence or presence of TG, the ATPase susceptibility is reduced to nearly zero in E2-fluoride forms *both* in the absence and presence of TG: this implies that TG does *not* release fluoride (*Table 2 in ref. 23, Table 1 in ref. 24*). Thus, the results in *Figure 1* also prove that TG binding to E2.BeF_x blocks the opening of the transport sites towards the luminal side of the ATPase nearly completely. The same is of course probably true for the other fluoride forms, which already in the absence of TG do not open easily.

The fact that TG not only prevents binding of cytosolic Ca²⁺ to E2, as already found long ago (*15-18, 25*), but also binding of luminal Ca²⁺ to E2.BeF_x (as found in the present report), is probably due to TG gluing transmembrane segments together (as many people in the field think, based on the structure of the E2.TG forms in *ref. 9* and simply on its protecting effect). In fact, accessibility of the transport sites to one side of the membrane and accessibility to the other side probably share a common prerequisite, namely the possibility for the protein to “breathe”, and thereby open cytosolic or luminal “gates” between the aqueous medium and the transmembrane binding sites. These breathing movements are probably prevented by TG (*21*). The fact that in E2P-related forms TG stabilizes a closed conformation of Ca²⁺ binding sites that would otherwise open towards the luminal side might be the reason why, in previous electron microscopy experiments, the luminal region of ATPase proved to be significantly different in the presence or absence of TG in 2-D crystals of ATPase grown in the absence of Ca²⁺ but presence of vanadate (*28*).

Implications for the ATPase 3D-structures to be derived from crystals.

Crystallization of an enzyme is a difficult task, for which the presence of strong inhibitors (among which transition state analogs and other inhibitors) has generally been found to be favourable, presumably because the formation of dead-end complexes of the enzyme with such inhibitors slows down protein dynamics and/or selects well-defined conformations. In many cases these “frozen” conformations are a great

help for understanding the catalytic cycle of the normal enzyme; in less favourable cases, certain features of the inhibitor-selected conformations might be more indicative of the enzyme-inhibitor complex than of the active enzyme itself. In the case of SR Ca²⁺-ATPase, the small number of crystalline forms available has provided immensely valuable insight into the functioning of the catalytic cycle, by revealing details we would not have ever known without crystallography. Conditions of crystallization might however have prevented in certain cases to derive all the desirable information.

From the present results, it appears that such was the case for the two crystals of Ca²⁺-free ATPase-fluoride forms that have already been described, E2MgF₄ and E2AlF₄ (*13-14*), and in which the Ca²⁺ release pathway from the ATPase transport sites towards the SR lumen was found closed. This can now most likely be ascribed to the fact that firstly, those ATPase-fluoride forms were prepared in the presence of either aluminium fluoride or magnesium fluoride, and secondly, they were prepared in the presence of TG. In relation with these crystals, it would have been desirable for us to be able to repeat our ⁴⁵Ca²⁺ binding experiments under less alkaline conditions, as the presently available Ca²⁺-free crystals of ATPase were all prepared at slightly acidic pH. Unfortunately, the low affinity with which, *a priori*, Ca²⁺ binds to E2P luminal sites at acidic pH (*34-35*), makes the experiment hopeless.

A likely (and unhappy) consequence of our findings is that future crystals of E2P-like forms, if they are grown in the presence of TG (as would seem reasonable, to compensate for the instability of these Ca²⁺-free forms in detergent (*e.g. 55*), will have only very little chance of ever being able to reveal in an open state the Ca²⁺ release pathway from the ATPase occlusion sites towards the SR lumen. Unfortunately again, this conclusion can probably be extended to crystals that might be grown in the presence of BHQ or CPA, despite the fact that these two other inhibitors of the ATPase probably bind to sites different from the one to which TG binds (*27, 56, 22, and Toyoshima, C. & Takahashi, M., unpublished results*). Nevertheless, to be more positive, our present results show that the E2.BeF_x form, if it can be stabilized in the absence of such a gluing agent, will hopefully provide the possibility of revealing the open state of this Ca²⁺ release pathway. Our Trp fluorescence measurements further substantiate

the similarity between E2BeF_x and genuine E2P. Based on the E2.MgF₄ structure (13) and judging from the Trp fluorescence results, we may anticipate that in genuine E2P and E2.BeF_x, the luminal half of M4 helix (which harbours Trp²⁸⁸) and M1 helix (which harbours Trp⁷⁷) could be more inclined (i.e. horizontal) than what was seen in E2.MgF₄, bringing those Trp's into hydrophobic environment and forming a larger space for Ca²⁺ to access from the luminal side.

Note, finally, that we did *not* obtain any evidence (see final discussion in *Supplemental Material*) for the existence of more (7, 57-58) than the two classical Ca²⁺ binding sites per ATPase monomer (although it is fair to recognize that our data cannot exclude the existence of those additional sites). These two binding sites for Ca²⁺, endowed with relatively poor affinity in E2P or E2.BeF_x states, can most probably be formed by reorganization of the residues which

are responsible, in other Ca²⁺-ATPase states, for the high affinity binding of cytosolic Ca²⁺. Such sites are likely to be similar to those predicted for the K⁺-binding sites in Na⁺,K⁺-ATPase (59), because the only critical difference is that Asn⁷⁹⁶ in Ca²⁺-ATPase is replaced with Asp in Na⁺,K⁺-ATPase.

Acknowledgements: We are happy to acknowledge fruitful discussions with colleagues at a recent ATPase meeting in Woods Hole, in particular with H. Suzuki (Asahikawa Medical College, J.V. Møller and J.P. Andersen (University of Aarhus), and D. B. McIntosh (University of Cape Town). We are also grateful to the Human Frontier Science Program Organization for financial support to M.P. (RGP 0060/2001-M).

REFERENCES

1. Makinose, M. (1972) *FEBS Lett.* **25**, 113-115.
2. Hasselbach, W. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **515**, 23-53.
3. de Meis, L., and Vianna, A. L. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 275-292.
4. Toyoshima, C., and Inesi, G. (2004) *Ann. Rev. Biochem.* **73**, 269-292.
5. Kühlbrandt, W. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 282-295.
6. Møller, J. V., Nissen, P., Sørensen, T. L., and le Maire, M. (2005) *Curr Opin Struct Biol.* **15**, 387-393.
7. Vieyra, A., Mintz, E., Lowe, J., and Guillain, F. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1667**, 103-113.
8. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. and Ogawa, H. (2000) *Nature* **405**, 633-634.
9. Toyoshima, C., and Nomura, H. (2002) *Nature* **418**, 605-611.
10. Toyoshima, C., Nomura, H., and Sugita, Y. (2003) *FEBS Lett.* **555**, 106-110.
11. Sørensen, T. L.-M., Møller, J. V., and Nissen, P. (2004) *Science* **304**, 1672-1675.
12. Toyoshima, C., and Mizutani, T. (2004) *Nature* **430**, 529-535.
13. Toyoshima, C., Nomura, H. and Tsuda, T. (2004) *Nature*, **442**, 361-368.
14. Olesen, C., Sørensen, T. L.-M., Nielsen, R. C., Møller, J. V., and Nissen, P. (2004) *Science* **306**, 2251-2255.
15. Sagara, Y., and Inesi, G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13503-1356.
16. Kijima, Y., Ogunbunmi, E., and Fleischer, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 22912-22918.
17. Sagara, Y., Wade, J. B., and Inesi, G. (1992a) *J. Biol. Chem.* **267**, 1286-1292.
18. Wictome, M., Michelangeli, F., Lee, A.G., and East, J. M. (1992a) *FEBS Lett.* **304**, 109-113.
19. Zhong, L., and Inesi, G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 12994-12998.
20. Xu, C., Ma, H., Inesi, G., Al-Shawi, M. K., and Toyoshima, C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 17973-17979.
21. Seekoe, T., Peall, S., and McIntosh, D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 46737-46744.
22. Obara, K., Miyashita, N., Xu, C., Toyoshima, I., Sugita, Y., Inesi, G., and Toyoshima, C. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**, 14489-14496.
23. Danko, S., Daiho, T., Yamasaki, K., Kamidochi, M., Suzuki, H. and Toyoshima, C. (2001) *FEBS Lett.* **489**, 277-282.
24. Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., and Suzuki, H. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 14991-14998.
25. Wictome, M., Henderson, I., Lee, A.G., and East, J. M. (1992b) *Biochem. J.* **283**, 525-529.
26. Wictome, M., Khan, Y. M., Lee, A.G., and East, J. M. (1995) *Biochem. J.* **310**, 859-868.

27. Khan, Y. M., Wictome, M., East, J. M., and Lee, A. G. (1995) *Biochemistry* **34**, 14385-14393.
28. Young, H. S., Xu, C., Zhang, P., and Stokes, D. L. (2001) *J. Mol. Biol.* **308**, 231-240.
29. Champeil, P., Guillain, F., Vénien, C. and Gingold, M. P. (1985) *Biochemistry* **24**, 69-81.
30. Cuenda, A., Henao, F., Nogues, M., and Gutiérrez-Merino, C. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1194**, 35-43.
31. Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 18745-18754.
32. Orłowski, S., and Champeil, P. (1991) *Biochemistry* **30**, 352-361.
33. Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S., and Singh, R. M. (1966) *Biochemistry* **5**, 467-77.
34. de Meis, L., Martins, O. B. and Alves, E. W. (1980) *Biochemistry* **19**, 4252-4261.
35. Verjovski-Almeida, S., and de Meis, L. (1977) *Biochemistry* **16**, 329-334.
36. Murphy, A. J., and Coll, R. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16990-16994.
37. Murphy, A. J., and Coll, R. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23307-23310.
38. Troullier, A., Girardet, J.-L., and Dupont, Y. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22821-22829.
39. Kubota, T., Daiho, T., and Kanazawa, T. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1163**, 121-143.
40. Yamasaki, K., Daiho, T., and Suzuki, H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13615-13619.
41. Lacapère, J.-J., Gingold, M., Champeil, P., and Guillain, F. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 2302-2306.
42. Champeil, P., le Maire, M., Møller, J. V., Riollot, S., Guillain, F., and Green, N. M. (1986) *FEBS Letters* **206**, 93-98.
43. de Foresta, B., Champeil, P., and le Maire, M. (1990) *Eur. J. Biochem.* **194**, 383-388.
44. Møller, J. V., Lenoir, G., Marchand, C., Montigny, C., le Maire, M., Toyoshima, C., Juul, B. S., and Champeil, P. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 38647-38659.
45. Guillain, F., Gingold, M.P., and Champeil, P. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7366-7371.
46. Inesi, G., Kurzmack, M., Coan, C., and Lewis, D. E. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 3025-3031.
47. Davidson, G. A. and Berman, M. C. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1289**, 187-194.
48. Bonnet, J.-P., Galante, M., Brethes, D., Dedieu, J.-C., and Chevallier, J. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* **191**, 32-41.
49. Champeil, P. (1996) in *Biomembranes* (Lee, A. G., ed.) vol. **5**, pp. 43-76, JAI Press Inc., Greenwich, CT.
50. Hasselbach, W., Medda, P., Migala, A., and Agostini, B. (1983) *Z. Naturforsch. [C]* **38**, 1015-1022.
51. Fernandez-Belda, F., Garcia de Ancos, J. G., and Inesi, G. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **854**, 257-264.
52. Scales, D. J., and Highsmith, S. R. (1984) *Z. Naturforsch. [C]* **39**, 177-179.
53. Jencks, W. P. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 18855-18858.
54. Sagara, Y., Fernandez-Belda, F., de Meis, L., and Inesi, G. (1992b) *J. Biol. Chem.* **267**, 12606-12613.
55. Lund, S., Orłowski, S., de Foresta, B., Champeil, P., le Maire, M., and Møller, J. V. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**, 4907-4915.
56. Logan-Smith, M. J., East, J. M., and Lee, A. G. (2002) *Biochemistry* **41**, 2869-2875.
57. Myung, J., and Jencks, W.P. (1994) *Biochemistry* **33**, 8775-8785.
58. Webb, R. J., Khan, Y. M., East, J. M., and Lee, A. G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 977-982.
59. Ogawa, H., and Toyoshima, C. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 15977-15982.

FOOTNOTES

Abbreviations : SR, sarcoplasmic reticulum; ATPase, adenosine triphosphatase; E2 and E1, non-phosphorylated forms of Ca²⁺-ATPase; E2P and E1P, phosphorylated forms of Ca²⁺-ATPase, respectively ADP-insensitive or ADP-sensitive; TG, thapsigargin; BHQ, 2,5-di-*tert*-butyl-1,4-dihydroxybenzene; CPA, cyclopiazonic acid; PK, proteinase K; EGTA, [ethylenedis-(oxyethylenenitrilo)]tetraacetic acid; Mops, 4-morpholinepropanesulfonic acid; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; Tes, N-tris[hydroxymethyl]methyl-2-aminoethanesulfonic acid; C₁₂E₈, octaethylene glycol monododecyl ether.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Trp fluorescence changes observed upon formation of Ca^{2+} -free ATPase-fluoride complexes in the presence of either AlCl_3 (Panels A&C) or BeCl_2 (Panels B&D) and upon addition of TG, in the absence (Panels A&B) or presence (Panels C&D) of A23187 used as a fluorescence quencher. The fluorometer cuvette contained 0.1 mg/ml SR in 100 mM KCl, 5 mM Mg^{2+} and 50 mM Mops-Tris at pH 7 and 20°C. Sequential additions were made, when indicated by arrows: EGTA (250 μM), KF (1 mM), AlCl_3 or BeCl_2 , both at 50 μM (Panels A&C and B&D, respectively), and TG (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each time). The excitation wavelength was 295 nm, and the emission wavelength was 315 nm (bandwidths were 2 and 10 nm, respectively). For the experiments in Panels C&D, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ A23187 had been added to SR before EGTA. In Panel B, the first addition of TG saturates the ATPase (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TG corresponds to about 1.5 μM TG, whereas 0.1 mg/ml SR corresponds to 0.5-0.7 μM ATPase), while further additions induce much smaller further quenching (see also refs. 17, 24). All traces were corrected for the (small) artefacts induced by dilution.

Figure 2. The fluorescence rise induced by formation of E2.BeF_x is most prominent at longest emission wavelengths, while quenching by TG or BHQ is most efficient at shortest wavelengths. The fluorometer cuvette contained 0.1 mg/ml SR in 100 mM KCl and 50 mM Mops-Tris at pH 7 and 20°C. When indicated by arrows, the following additions were made: EGTA (250 μM), Mg^{2+} (5 mM), KF (1 mM), BeCl_2 (50 μM), and either TG (Panels A to C) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, i.e. 1.5 μM , at each addition) or BHQ (Panels D to F) (1 μM at each addition). The excitation wavelength was 295 nm, and the emission wavelength was 315 nm for Panels A & D, 330 nm for Panels B & E, and 355 nm for Panels C & F. Bandwidths were 2 and 10 nm, respectively, for excitation and emission. BHQ induces an inner filter effect due to its small absorbance at 295 nm (about 0.6-0.8% for 1 μM BHQ); the apparent fluorescence quenching due to this inner filter effect is slightly more prominent at 355 nm than at 315 or 330 nm, because BHQ also emits some fluorescence at 315 or 330 nm, but very small at 355 nm, so that at 315 or 330 nm the real inner filter effect is partially compensated for by the BHQ fluorescence (at either 315 or 330 nm, about 0.3-0.5 % of the corresponding fluorescence of 0.1 mg/ml SR). All traces were corrected for the (small) artefacts induced by dilution.

Figure 3. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to E2.BeF_x and other E2-related forms, during perfusion with 200 μM $^{45}\text{Ca}^{2+}$, and effect of TG. SR vesicles were preincubated for 30 minutes in various preincubation media, at 0.3 mg/ml protein and here in the additional presence of 0.003 mg/ml calcimycin (ionophore A23187). In Panel A, circles correspond to a control fluoride-free preincubation medium, containing 100 mM KCl, 5 mM Mg^{2+} , 50 mM Mops-Tris (at pH 7 and 20°C), 250 μM EGTA and 20 % DMSO (v/v) (ATPase in its E2 form); triangles correspond to experiments where, in addition, this medium contained 1 mM KF and 50 μM BeCl_2 (ATPase was converted to its E2.BeF_x form). In Panel B, squares correspond to experiments where this medium contained 1 mM (open squares) or 3 mM (dotted squares) Pi (ATPase in its E2P form); upside-down triangles correspond to experiments where this medium contained 1 mM vanadate, either ortho-vanadate (open upside-down triangles) or decavanadate (dotted open upside-down triangles). At the end of this preincubation period (which, when fluoride was present, was more than sufficient to lead to complete inactivation, see Figure S3 in Supplemental Material), 2 ml aliquots of the preincubated samples (i.e. 0.6 mg protein) were loaded onto Millipore GS filters and perfused for various periods manually (i.e. with variable volumes of perfusion medium), with a perfusion (and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding) medium containing 200 μM $^{45}\text{Ca}^{2+}$, 200 μM [^3H]glucose, 100 mM KCl, 5 mM Mg^{2+} , 20 % DMSO and 100 mM Tes-Tris at pH 8 and 20°C. The filter was counted for both ^3H and $^{45}\text{Ca}^{2+}$, without washing, and bound $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was obtained (thanks to the ^3H counts) by subtracting $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ions trapped together with the wetting fluid from the total $^{45}\text{Ca}^{2+}$ on the filter. For closed symbols in Panel A, TG (at 0.003 mg/ml) was added to the preincubated samples immediately before loading them onto the filter and perfusing them with $^{45}\text{Ca}^{2+}$. “sp.” (specific) and “non-sp.” (non-specific) refer to binding of Ca^{2+} to Ca^{2+} -ATPase and to other binding sites, respectively.

Figure 4. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (at 200 μM) binds to E2.BeF_x (and not much to E2.MgF_4) from the luminal side, and TG prevents this luminal binding. To a medium containing 100 mM KCl, 5 mM Mg^{2+} , 50 mM Mops-Tris (at pH 7 and 20°C), 250 μM EGTA and 20 % DMSO (v/v) in the absence or presence of 1 mM KF (either alone or together with 50 μM BeCl_2), SR vesicles were added at 3 mg protein/ml. In the presence of fluoride but absence of beryllium, incubation lasted 90 minutes, allowing for formation of the E2.MgF_4 complex (*Panels C & F*, diamonds); in the presence of both fluoride and beryllium, incubation lasted half an hour, allowing for formation of the E2.BeF_x complex (*Panels B & E*, triangles); control samples were left in the absence of fluoride and beryllium for a few minutes, so that the ATPase was in the E2 state (*Panels A & D*, circles). At the end of this preincubation period (which, when fluoride was present, was more than sufficient to lead to complete inactivation, see *Figure S3 in Supplemental Material*) each of the three samples was separated in four aliquots (1 ml each, typically). Calcein (ionophore A23187) at 0.03 mg/ml, i.e. 1 % w/w with respect to SR protein, was added to two of these aliquots, and TG (also at 0.03 mg/ml) was also added to two of the four aliquots, one with ionophore and one without (closed symbols correspond to the aliquots supplemented with TG, and open symbols correspond to control aliquots in the absence of TG). Each aliquot was then diluted 10-fold (e.g. 0.9 ml in 9 ml final volume) into a final $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding medium (0.3 mg/ml SR protein and 25 μM EGTA from the preincubation medium, as well as 225 μM total $^{45}\text{Ca}^{2+}$, 225 μM [^3H]glucose, 100 mM KCl, 5 mM Mg^{2+} , 20 % DMSO and 90 mM Tes-Tris (and 5 mM Mops-Tris from the preincubation medium) at pH 8 and 20°C), and after various periods of incubation 2-ml sub-aliquots were filtered through a Millipore GS filter, and the filter was counted. *Panels A & D* are labelled “E2”, because for these Panels the ATPase initially is in the E2 form; but of course, after Ca^{2+} binding to the ATPase high-affinity sites, the ATPase is in its classical $\text{Ca}_2\text{E1}$ state.

Figure 5. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (at 100 μM) binds to E2.BeF_x from the luminal side, and not to E2.AlF_4 . This experiment is similar to that illustrated in *Figure 4*, except that in this case the third sample (squares) was prepared as E2.AlF_4 instead of E2.MgF_4 (i.e. it was preincubated with 1 mM KF and 50 μM AlCl_3 , for 15 minutes), and the final $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding medium was at pCa 4 instead of pCa 3.7 (final total concentrations were 125 μM for $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and 25 μM for EGTA); Tes-Tris was at 45 mM in this experiment, instead of 90 mM. 0.3 mg protein aliquots (instead of 0.6 mg) were filtered to evaluate bound $^{45}\text{Ca}^{2+}$, and in this case HA filters were used instead of GS filters.

Figure 6. BHQ and CPA, like TG, prevent the luminal opening of the Ca^{2+} transport sites in E2.BeF_x . The experiment was similar to that illustrated in *Figure 4*, except that ionophore was present in all cases. *Panel A*: experiments with ATPase initially present as E2, either in the absence of any inhibitor (open circles, as in *Figure 1*), or in the presence of TG (closed circles), or in the presence of CPA (upside-down open triangles), or again in the presence of BHQ at two different concentrations (open and closed squares, respectively); *Panel B*: experiments with ATPase initially present as E2.BeF_x , again in the absence of any inhibitor (open right-side-up triangles, as in *Figure 1*), or in the presence of CPA (upside-down open triangles), or in the presence of TG (closed right-side-up triangles, hidden behind the open upside-down triangles), or again in the presence of BHQ at two different concentrations (open and closed squares, respectively). The concentrations of SR and inhibitors during incubation with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ were 0.3 mg protein/ml (about 1.5 μM ATPase) and 4.5 μM TG (0.003 mg/ml), 9 μM CPA (0.003 mg/ml), or either 3 or 150 μM BHQ (0.00066 or 0.033 mg/ml). NB: To illustrate reproducibility, all data points obtained in the absence of inhibitor in three separate experiments have been plotted here (open circles and open right-side-up triangles in *Panels A* and *B*, respectively). It is also the case for three separate experiments performed in the presence of TG, which on this scale are indistinguishable (closed circles and closed right-side-up triangles in *Panels A* and *B*, respectively; they are hardly visible, because they all fall behind the upside-down open triangles).

Fig 1. In contrast with what happens upon formation of $E2.AlF_4$, formation of $E2.BeF_x$ *raises* Trp fluorescence. TG reduces it, much more for $E2.BeF_x$ than for $E2.AlF_4$. In the presence of the fluorescence quencher A23187, the signal due to $E2.BeF_x$ formation has an opposite sign.

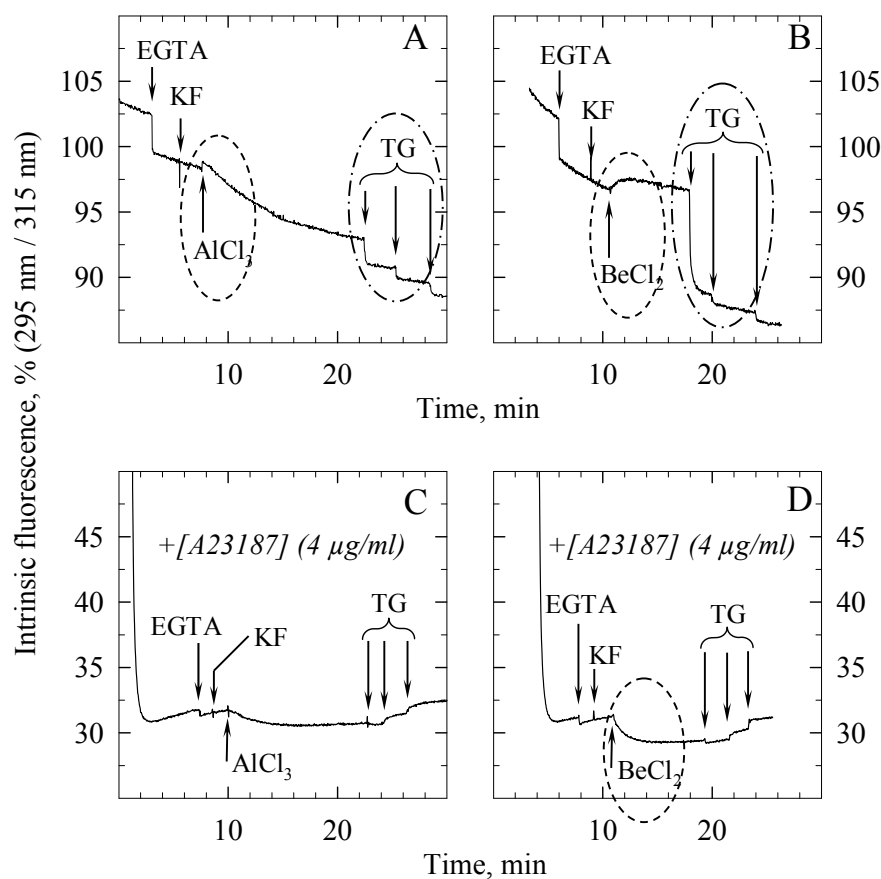


Fig 2. Fluorescence quenching by TG or BHQ is largest at shortest emission wavelengths, but the opposite is true for the fluorescence rise due to $E2.BeF_x$ formation.

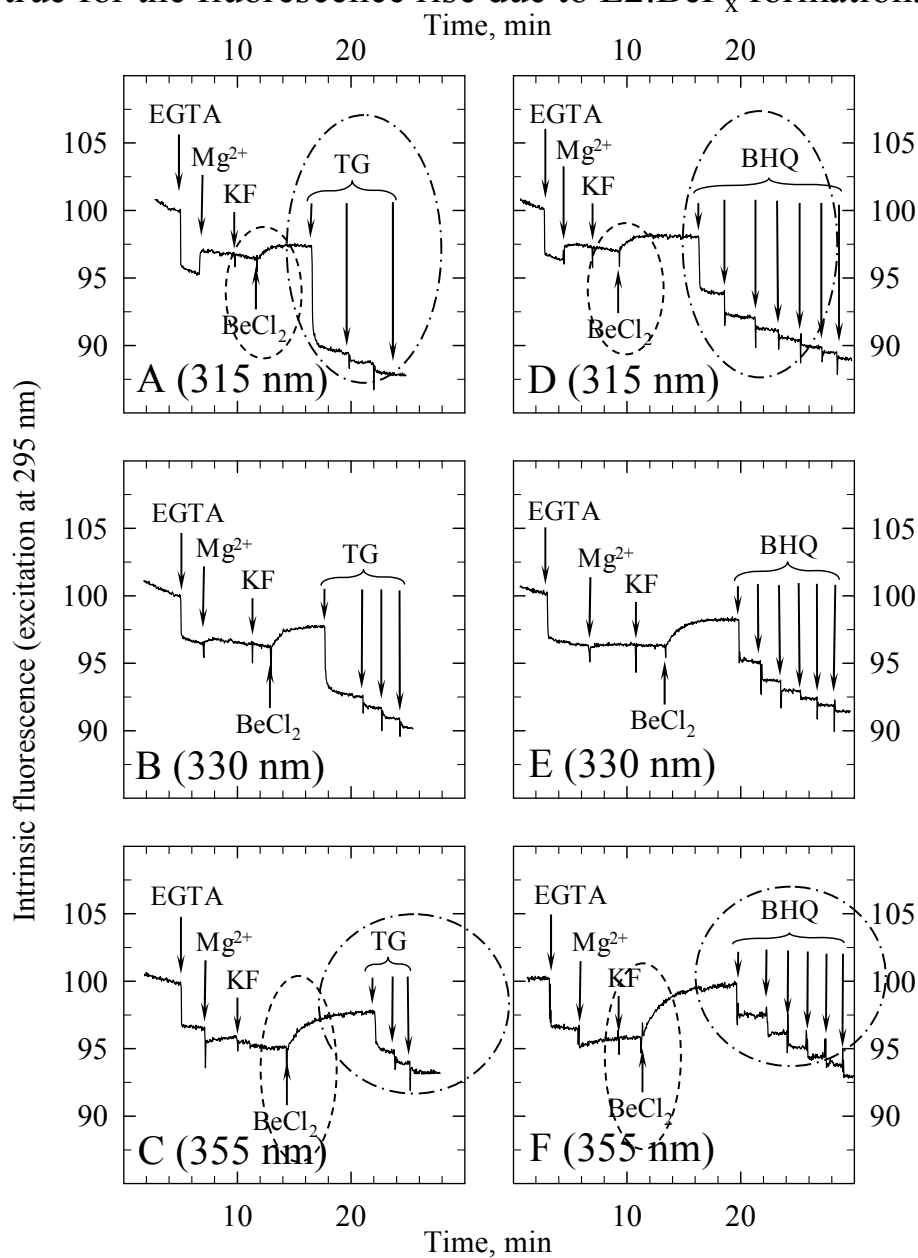


Fig 3. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binds to the luminal side of E2.BeF_x within seconds. For such an experiment, E2.VO_4 is not stable enough (this is also true for E2P).

(SR vesicles made *leaky* with ionophore)

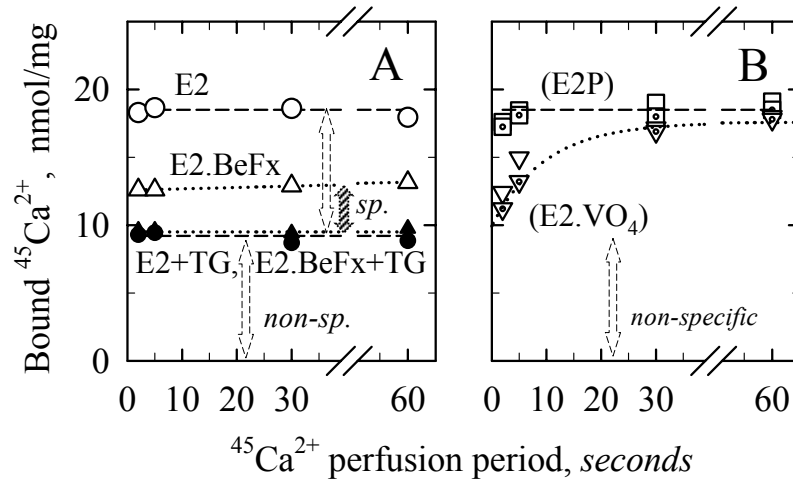


Fig 4. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (at 200 μM) binds to E2.BeF_x from the luminal side (and not to E2.MgF_4). TG prevents this luminal binding.

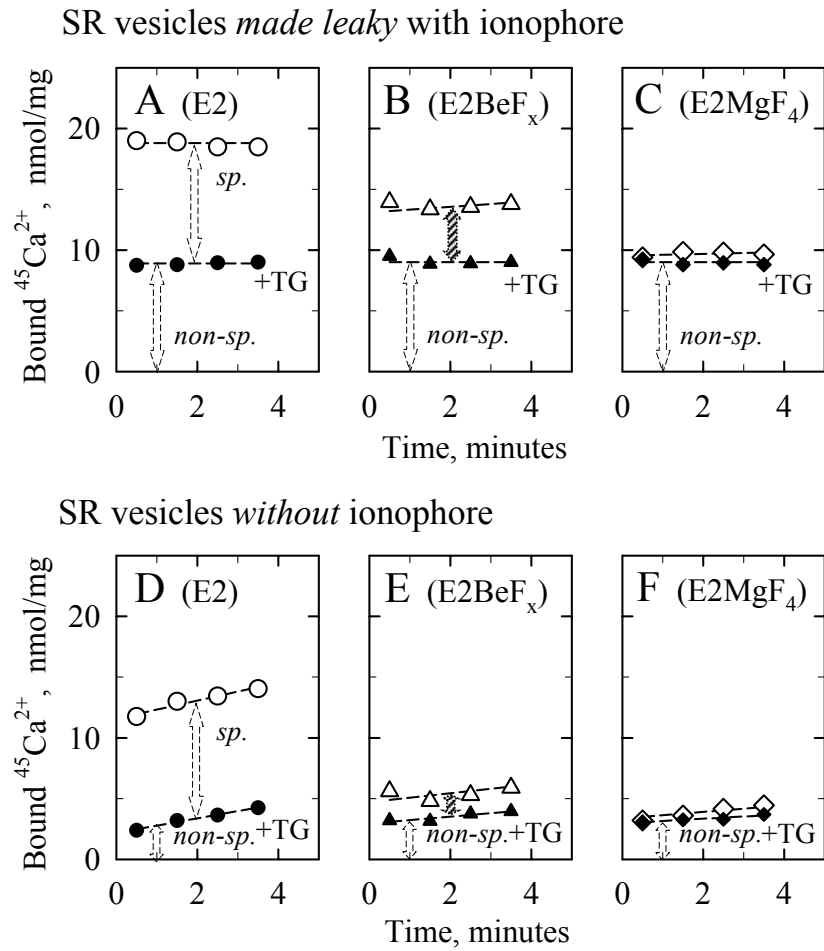


Fig 5. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (at $100\ \mu\text{M}$) binds to E2.BeF_x from the luminal side, but not to E2.AlF_4 .

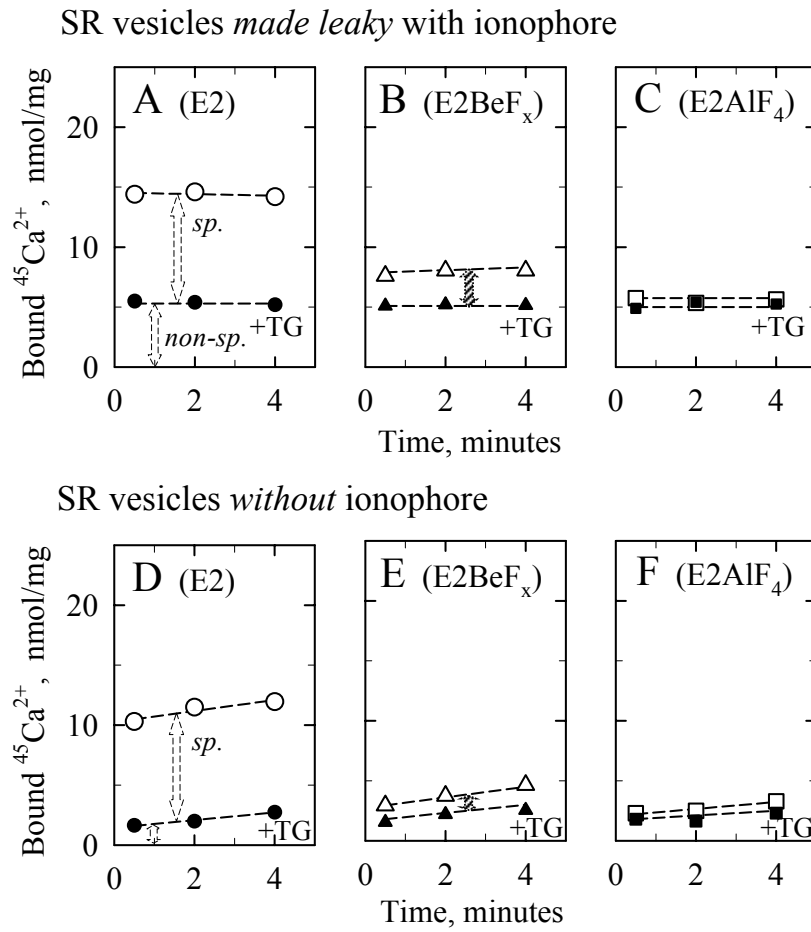
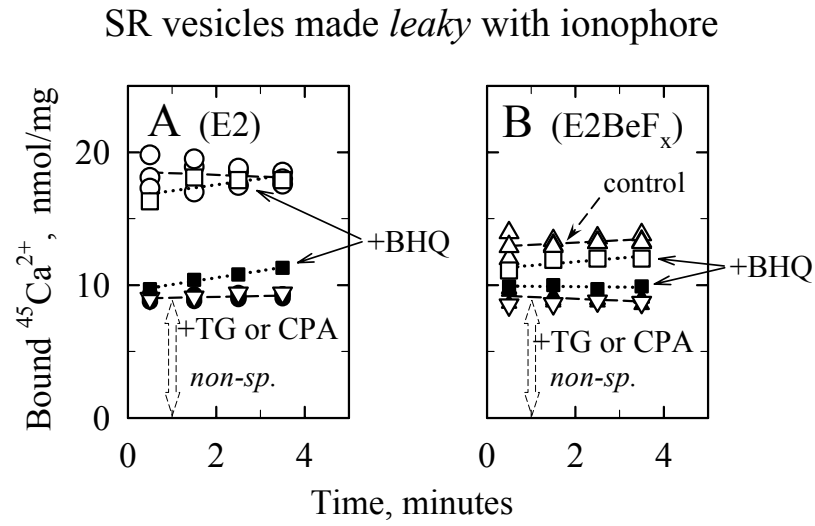


Fig 6. BHQ and CPA, like TG, prevent binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to the lumenally-oriented binding sites in E2.BeF_x



Supplemental Material for the manuscript:

Effects of inhibitors on luminal opening of Ca^{2+} binding sites in an E2P-like complex of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase with Be^{2+} -fluoride

by

Martin Picard[§], Chikashi Toyoshima[¶], and Philippe Champeil[§]

[§] *Unité de Recherche Associée 2096 (CNRS), Service de Biophysique des Fonctions Membranaires (CEA) and Institut Fédératif de Recherche 46 (Université Paris-Sud), Département de Biologie Joliot-Curie at CEA-Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex (France), and*

[¶] *Institute of Molecular and Cellular Biosciences,
University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032 (Japan).*

Fig S1. In the absence of Ca^{2+} , formation of E2.BeF_x raises Trp fluorescence, but in the presence of Ca^{2+} and ADP, addition of Be.fluoride does not: Be.fluoride and Al.fluoride do behave differently.

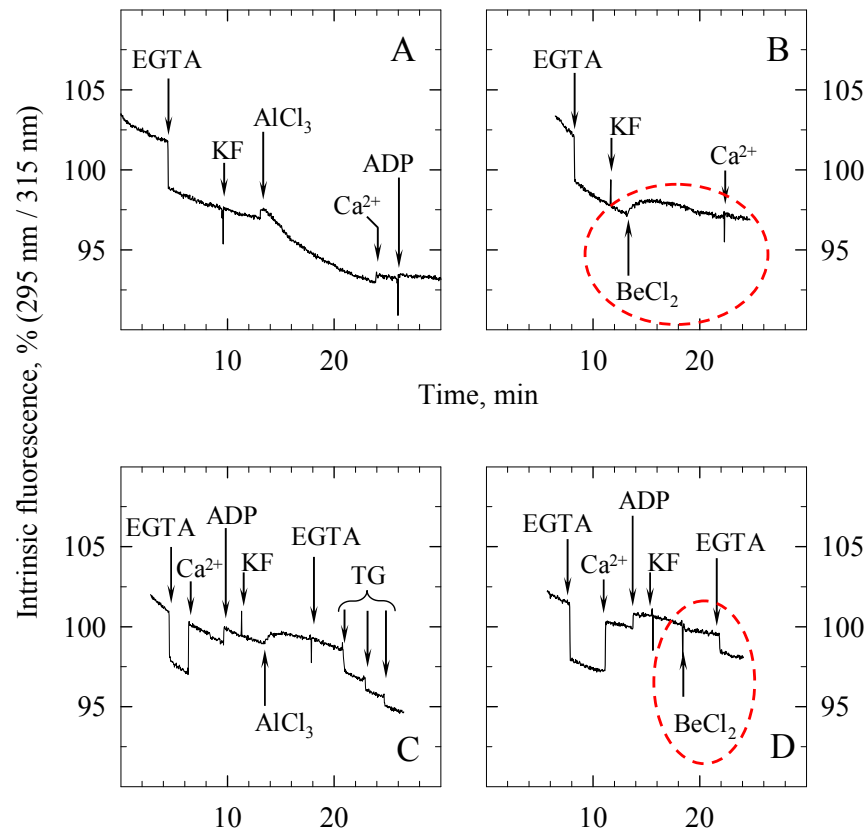


Figure S1. Trp fluorescence changes observed after addition of either AlCl₃ (Panels A&C) or BeCl₂ (Panels B&D), in the presence of fluoride and either EGTA (Panels A&B) or Ca²⁺ and ADP (Panels C&D). These experiments were performed in the same series as those illustrated in Figure 1 of main text. Sequential additions (indicated by arrows) were: EGTA (250 μM), KF (1 mM), AlCl₃ (Panels A&C) or BeCl₂ (Panels B&D), both at 50 μM , and, when desired, Ca²⁺ (300 μM), ADP (100 μM) or TG (1 $\mu\text{g/ml}$ each time). The excitation wavelength was 295 nm, and the emission wavelength was 315 nm (bandwidths were 2 and 10 nm, respectively). Note that addition of TG to E1.ADP.AlFx in Panel C induced only minimal fluorescence quenching. All traces were corrected for the (small) artefacts induced by dilution.

Fig S2. Trp quenching by BHQ, too, is more efficient for E2.BeF_x than for other E2 forms (here, E2.AlF₄), and least efficient for E1 forms (here, Ca₂E1.ADP.AlF_x).

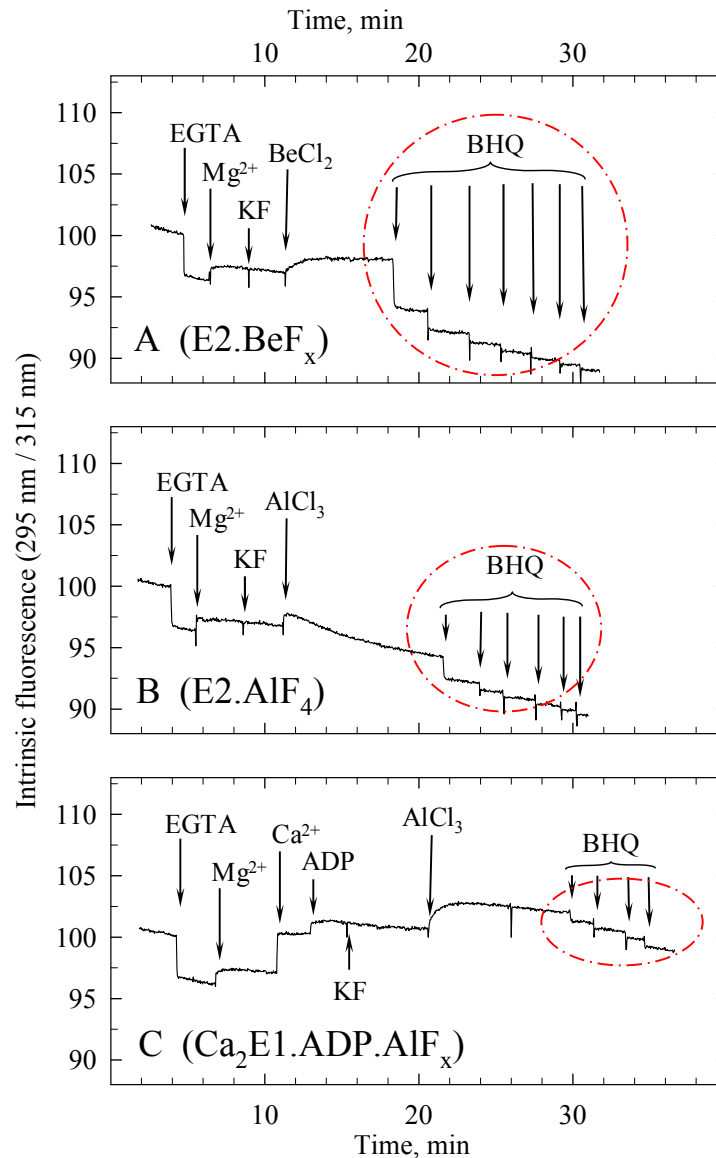


Figure S2. Fluorescence quenching by BHQ, too, is more efficient with E2.BeF_x than with other E2 forms (here, E2.AlF₄), and least efficient for E1 forms (here, Ca₂E1.ADP.AlF_x). The fluorometer cuvette contained 0.1 mg/ml SR in 100 mM KCl and 50 mM Mops-Tris at pH 7 and 20°C. When indicated by arrows, the following additions were made: for *Panel A*, EGTA (250 μM), Mg²⁺ (5 mM), KF (1 mM) and BeCl₂ (50 μM); for *Panel B*, EGTA, Mg²⁺, KF and AlCl₃ (50 μM); for *Panel C*, EGTA, Mg²⁺, Ca²⁺ (300 μM), ADP (100 μM) and AlCl₃ (50 μM); then, in all three cases, sequential additions of BHQ were made (1 μM each addition). The excitation wavelength was 295 nm, and the emission wavelength was 315 nm; bandwidths were 2 and 10 nm, respectively, for excitation and emission. All traces were corrected for the (small) artefacts induced by dilution.

Further discussion of the fluorescence results.

As stated in the main text, the drop in fluorescence observed in the presence of a hydrophobic quencher upon formation of the E2.BeF_x complex (and also upon formation of genuine E2P, see *refs. 42-43*) could imply that formation of this complex is accompanied by a fluorescence rise for membrane-embedded Trp residues but by a fluorescence drop for those Trp residues too far away from the membrane to be quenched by A23187, e.g. Trp⁵⁵². Alternatively, ligand-induced fluorescence changes in the presence of quencher might also reveal vertical movements of the ATPase, for instance if the ATPase sinks into the membrane, as was once suggested to occur in the presence of vanadate, based on electron microscopy observations after cryofracture (*50, 52*).

Fig S3. Fluoride-dependent inhibition of ATPase activity during preincubation in the presence of DMSO.

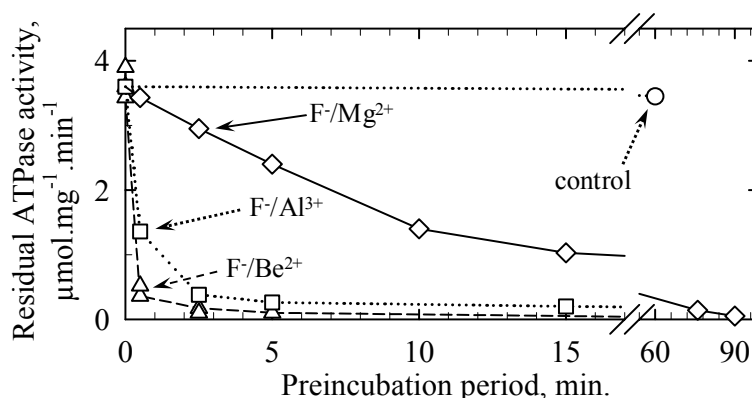
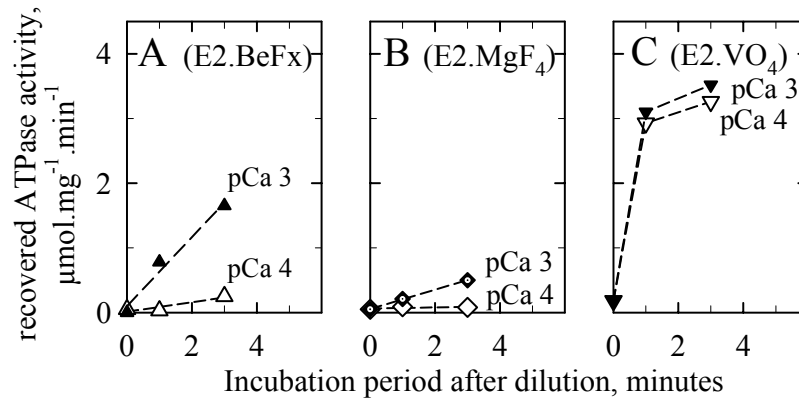


Figure S3. Time course of ATPase inhibition by fluoride in the presence of DMSO. The final buffer for preincubation of ATPase with fluoride consisted of 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 20 % DMSO (v/v), 250 μM EGTA and 50 mM Mops-Tris at pH 7 and 20 °C. Except for the control experiments (open circles), it was supplemented with 1 mM KF, either alone (note that Mg²⁺ was however present, allowing slow formation of the E2.MgF₄ species) (diamonds) or together with 50 μM AlCl₃, to form E2.AlF₄ (squares) or with 50 μM BeCl₂, to form E2.BeFx (triangles), again in the presence of Mg²⁺. SR was added at time zero, at 3 mg protein/ml. To measure residual ATPase activity, 4 μl aliquots were taken after preincubation for various periods, and diluted into 2 ml of a standard ATPase assay medium containing 100 mM KCl, 50 mM Tes-Tris (at pH 7.5 and 20°C), 1 mM Mg²⁺, 1 mM MgATP, 1 mM phosphoenolpyruvate, 0.1 mg/ml pyruvate kinase, 0.3 mM NADH and 0.1 mg/ml lactate dehydrogenase, as well as 0.1 mM Ca²⁺, 0.05 mM EGTA and 0.5 mg/ml C₁₂E₈. The activities shown have been corrected for the very small ATPase activity (or NADH oxidation rate) observed in control experiments in the absence of free Ca²⁺ (about 0.1 μmol.mg⁻¹.min⁻¹). Note that under these conditions, the presence of a Ca²⁺ ionophore was not required (not shown) for ATPase reaction with beryllium fluoride, at variance with a previous report (37).

Fig S4. Ca^{2+} -induced recovery of the ATPase activity of fluoride- or vanadate-inhibited forms. Effect of pCa and DMSO.

dilution of various samples at pCa 4 or 3 in the presence of DMSO



dilution of E2.BeFx into various media :

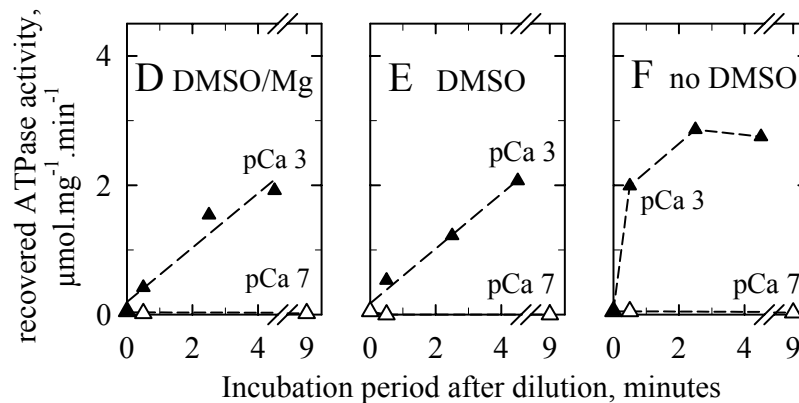


Figure S4. Recovery of ATPase activity under various conditions. Panels A&B: SR ATPase (3 mg/ml) was first reacted with fluoride in the presence of Be^{2+} and Mg^{2+} (Panel A) or of Mg^{2+} alone (Panel B), as described in the legend to Figure S3. At the end of this preincubation period, ionophore was added (0.03 mg/ml of A23187), and samples were diluted 10-fold under conditions similar to those of the experiments illustrated in Figure 4, except that the final pCa was either 4 or 3 (25 μM EGTA and either 125 μM or 1.025 mM of total Ca^{2+} , open and closed symbols, respectively). After various periods of incubation in this Ca^{2+} -containing diluted medium, 40 μl aliquots were further diluted into the ATPase assay medium previously described in the legend to Figure S3, and the ATPase activity recovered was measured. Panel C: same experiment, except that during the preincubation period, SR ATPase was not reacted with fluoride but with 0.1 mM ortho-vanadate (this also lead to complete inhibition). Panels D to F: same experiment again, except that after SR ATPase reaction with fluoride in the presence of Be^{2+} and Mg^{2+} , and addition of ionophore, as for Panel A, samples were diluted in various media, either at pCa 3 or pCa 7 (25 μM EGTA and either 1.025 mM added Ca^{2+} or no added Ca^{2+}), again containing 100 mM KCl and 100 mM Tes-Tris at pH 8, but now either with 20 % DMSO and 5 mM Mg^{2+} as for Panel A (Panel D), or with DMSO alone (Panel E; thus, the final Mg^{2+} concentration was 0.5 mM, instead of 5 mM), or again with neither DMSO nor Mg^{2+} (Panel F; thus, the final DMSO concentration was only 2 %). The activities shown here have been corrected for the very small ATPase activity (or NADH oxidation rate) observed in control experiments in the absence of free Ca^{2+} (about 0.1 $\mu\text{mol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$). 100 % activity is 3.5-4.0 $\mu\text{mol.Pi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, see Figure S3.

Further description of the results in *Figure S4*, about Ca^{2+} -induced destabilization of E2BeF_x or other putative E2P-like states.

As stated in the main text, it would be desirable to be able to measure $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to E2.BeF_x at Ca^{2+} concentrations higher than the 100 or 200 μM used in *Figures 3-5* of main text. However, in addition to signal-to-noise ratio problems, such measurements would have to face another problem: as previously shown (*24*), the presence of a high Ca^{2+} concentration on the luminal side of E2.BeF_x destabilizes this form and allows it to experience transition to an active E1 form, so that $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to the initially E2.BeF_x form might be obscured by $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to the recovered active form. As stated in the main text, the very fact that $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to E2.BeF_x in *Figures 3-5* of main text was fairly stable ensures that this was not a concern in those experiments, performed at 100-200 μM free Ca^{2+} . Nevertheless, the time course for Ca^{2+} -induced activity recovery at two different Ca^{2+} concentrations was checked here, under our exact ionic and DMSO conditions. For this purpose, to evaluate their ATPase activity, aliquots of ATPase samples were diluted into a standard assay medium after their initial preincubation in the presence of fluoride, addition of ionophore, and subsequent dilution (at time zero) into a medium with a final free Ca^{2+} concentrations of either 0.1 mM or 1 mM (pCa 4 or pCa 3, respectively). For E2.BeF_x , less than 10 % of the control ATPase activity was recovered after 3 minutes incubation in the pCa 4 medium, but about 50 % was recovered after 3 minutes incubation in the pCa 3 medium (*Panel A in Figure S4*). For E2.MgF_4 , (*Panel B in Figure S4*) ATPase recovery was much slower, as previously described (*24*), and for E2.AlF_4 it was intermediate (not shown).

Interestingly, *Panel C in Figure S4* shows that when the ATPase had been preincubated with orthovanadate instead of fluoride (but otherwise under the same conditions), Ca^{2+} -induced recovery at both pCa 4 and pCa 3 was virtually complete already one minute after dilution in the Ca^{2+} -containing medium: thus, for measuring whether luminal $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to E2.VO_4 occurs, the E2.VO_4 ATPase form would *not* be stable enough. This is what *Figure 3B* in main text shows.

Similarly, *Panels D to F in Figure S4* show ATPase activity recovery when ATPase in the E2.BeF_x form was diluted in various media buffered at pH 8: compared to 20 % DMSO and 5 mM Mg^{2+} (*Panel D*), lowering the Mg^{2+} concentration to 0.5 mM had no obvious effect (*Panel E*), but omitting DMSO did make ATPase recovery much faster (*Panel F*): thus, the presence of 20 % DMSO in the binding buffer of our experiments helps stabilizing the E2.BeF_x form (presumably by the same mechanism by which as it stabilizes the genuine E2P form).

**Fig S5. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binds to purified ATPase in E2.BeF_x .
This binding increases over long periods of time.
TG again prevents it.**

deoxycholate-purified ATPase, without ionophore

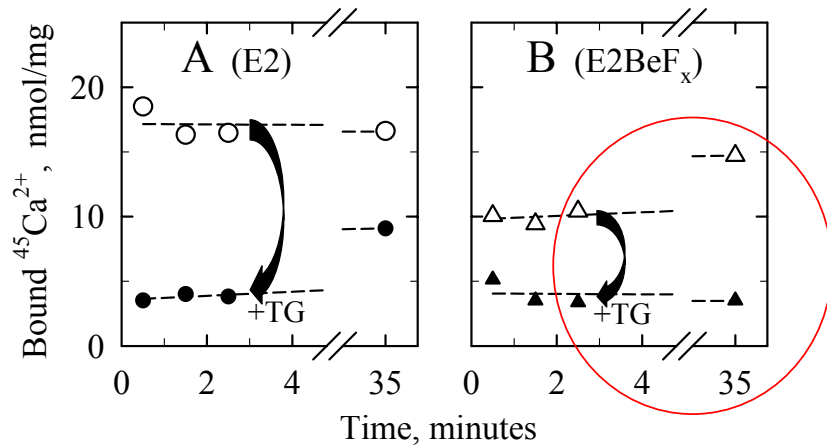


Figure S5. $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binds to deoxycholate-purified ATPase initially in the E2BeF_x state, in the absence of ionophore. Binding increases over long periods of time, and TG again prevents this binding. The experiment was again similar to that illustrated in Figure 4 of main text, except that in this case deoxycholate-purified ATPase was used, in the absence of added ionophore. In addition, bound $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was measured both after a few minutes, as before, and after a much longer incubation period.

Further description of the results in Figure S5, about $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to purified ATPase in its E2BeF_x state.

One possibility for minimizing the problems due to non-specific binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to internal sites in permeabilized SR vesicles could be to use purified ATPase, prepared for instance by treatment of SR vesicles with sub-solubilizing concentrations of deoxycholate; such ATPase membranes have lost most of their non-ATPase proteins, and in addition, they are completely leaky to Ca^{2+} (e.g. Andersen, J. P., Lassen, K., and Møller, J. V. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 371-380). Thanks to Pr J.V. Møller, who kindly provided us with purified ATPase prepared in his lab, we were able to perform experiments similar to those illustrated in Figure 4, but now using purified ATPase as the starting material. Results were qualitatively similar, except that in this case, as expected, non-specific binding was indeed reduced, and ionophore was *not* required to reveal $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to E2.BeF_x (Figure S5 above).

Note that in these experiments, bound $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was measured both after a few minutes, as before, and after a much longer incubation period. In the absence of TG the amount of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ bound to ATPase initially in the E2.BeF_x (Panel B) was clearly higher after half an hour, presumably due to Ca^{2+} -induced destabilization of E2.BeF_x , as was documented in Figure S4.

Note also that after half an hour in the presence of TG, with ATPase initially in its E2 (+TG) state, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ succeeded to some extent in binding to E2+TG (Panel A). This presumably reflects the fact that TG dramatically slows down $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding and makes it of poor affinity but does not block it completely (cf refs. 18, 26). Simultaneously, it confirms that under our conditions this very slow binding cannot be responsible for the TG-resistant binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ that we measure after short periods in Figures 3 or 4 of main text. Note that after the same period of time, TG keeps blocking $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding to E2.BeF_x .

Supplemental discussion about previous results by Vieyra et al. (2005)

Using a rationale similar to ours but working in the absence of KCl and at higher DMSO concentrations (30 or 40 % v/v), Vieyra et al. (Z) reported $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding measurements which they considered to evidence luminal binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to E2P. However, a point in those measurements which we find difficult to understand is that in the presence of 30 % DMSO (and 20 mM Mg^{2+}), binding of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ to the luminal sites of E2P had to be analyzed as being very slow (half-time of about 10 minutes at pCa 4), a puzzling result for binding to Ca^{2+} sites of poor affinity. Surprisingly also, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding appeared to in fact be *less* slow (it was then completed within 1 minute) when DMSO was *increased* from 30 to 40 % DMSO (and Mg^{2+} was reduced from 20 to 5 mM Mg^{2+}). We did not perform experiments at 30 % DMSO, but we did perform a few of them at 40 % DMSO (in the absence of KCl, as in Vieyra et al.'s experiments), and we were not really able to confirm those results; in addition, in our hands, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding itself, at 40 % DMSO, was the rate-limiting for Ca^{2+} -induced dephosphorylation, and the E2P hydrolysis step *per se* was not rate-limiting. Also, we did *not* find any evidence for ADP-dependent increase in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ binding beyond the normal level of 2 Ca^{2+} ions per ATPase: we only found ADP-induced *acceleration* of this binding, up to the normal level of 2 ions per ATPase, and this was the case both for E2 and for E2P. We have no good explanation for these experimental discrepancies between our work and that of Vieyra et al. It might be that SR vesicle aggregation at too high DMSO concentrations (like 30 % v/v) somehow blurs the picture, whereas vesicles do *not* aggregate in the less extreme conditions which we have chosen, namely 20 % DMSO in the presence of 100 mM KCl.

Chapitre VI: Interaction des membranes de réticulum et de leur ATPase-Ca²⁺ avec les polymères amphiphiles.

1. Protection des membranes de réticulum contre leur floculation (Manuscrit # 5)

1.1. Introduction

1.2. Résultats et discussion

2. Effet de différents amphipols sur l'ATPase-Ca²⁺ : protection ou inhibition ? (Manuscrit # 6)

2.1. Introduction

2.2. Préliminaires : effet des ions divalents sur l'agrégation de l'amphipol seul en solution

2.3. Effet de différents amphipols sur l'activité ATPasique de SERCA1a

2.4. Effet protecteur des différents amphipols vis-à-vis de la dénaturation irréversible de l'ATPase solubilisée, lors de son incubation dans un milieu dépourvu de Ca²⁺

2.5. Effet protecteur des différents amphipols vis-à-vis de la dénaturation irréversible de l'ATPase lors de sa dilution dans un milieu dépourvu de détergent

2.6. Une expérience clef ? Effet des amphipols sur une étape particulière, la dissociation du calcium

2.7. Conclusions

3. Manuscrit # 5 :

Stabilization of membranes upon interaction of amphipathic polymers with membrane proteins.

Picard, M., Duval-Terrié, C., Dé, E., and Champeil, P. (2004)
Protein Science 13, 3056-3058.

4. Manuscrit # 6 :

Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study.

Martin Picard, Tassadite Dahmane, Manuel Garrigos, Carole Gauron, Fabrice Giusti, Marc le Maire, Jean-Luc Popot, and Philippe Champeil
Biochemistry, *accepté*.

Chapitre VI: Interaction des membranes de réticulum et de leur ATPase-Ca²⁺ avec les polymères amphiphiles.

Les protéines membranaires sont particulièrement difficiles à manipuler en solution : elles ne sont actives et stables que dans un environnement approprié, susceptible de remplacer leur environnement membranaire natif. L'utilisation de détergents permet cependant leur extraction hors de la membrane et le maintien de leurs domaines transmembranaires dans un environnement hydrophobe. Il existe une très grande diversité de détergents, aux propriétés physico-chimiques variées (le Maire et al. 2000). Malheureusement, il n'existe pas de règle générale quant à leur utilisation: un même type de détergent peut être approprié à la manipulation de certaines protéines seulement. Pour une protéine donnée, certains détergents sont efficaces pour certaines tâches (comme par exemple la solubilisation de cette protéine) mais pas pour d'autres (sa cristallisation). Enfin, il existe de nombreux exemples de détergents ayant des effets délétères sur le fonctionnement de certaines protéines (inhibition d'activité, perte de sous-unités fonctionnelles, ...).

De nouvelles molécules ont été synthétisées dans le but de prévenir ces différents inconvénients. Parmi celles-ci, des polymères amphiphiles, surnommés « amphipols » (*amphipatic polymers*), sont particulièrement prometteurs. Ces polymères ont un squelette hydrophile sur lequel sont greffées des chaînes hydrophobes. Ils sont conçus pour maintenir les protéines membranaires stables en solution, dans un état que l'on espère être natif, grâce à « l'attachement multipoint » des chaînes alkyles du polymère à la surface hydrophobe (transmembranaire) de la protéine. Le membre le plus étudié de cette famille de polymères est appelé « A8-35 » ; il a une masse moléculaire de 8 kDa, et une chaîne grasse en C8 est greffée via une liaison amide sur 35 % des monomères de son squelette polyacrylique. Son efficacité à stabiliser des protéines membranaires modèles (bactériorhodopsine, centre réactionnel d'une bactérie photosynthétique, cytochrome b6f, porine..) a été établie (Tribet et al. 1996). Une première étude de son interaction avec l'ATPase-Ca²⁺ a été réalisée dans notre laboratoire (Champeil et al. 2000), et elle a donné des résultats encourageants tout en indiquant quelques zones d'ombre. Il a été montré que le A8-35 ne permettait pas d'extraire l'ATPase de son environnement lipidique, mais permettait de stabiliser l'ATPase solubilisée : en présence de détergent, le A8-35 protège l'ATPase vis-à-vis d'une éventuelle dénaturation irréversible. L'activité ATPasique de la protéine est toutefois inhibée de façon réversible. Dans ces expériences, le A8-35 testé présentait également l'inconvénient d'entraîner l'aggrégation de l'ATPase en absence complète de détergent.

Ma formation, durant la thèse, à l'étude d'une protéine membranaire, se devait d'inclure un apprentissage de la manipulation de l'ATPase dans un état solubilisé. C'est dans ce cadre, principalement, que se situent les études que j'ai menées concernant l'interaction des amphipols avec l'ATPase-Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique. Je commenterai d'abord l'effet inattendu que nous avons mis en évidence au cours d'une première étude qui voulait confirmer la faible capacité de ces polymères amphiphiles à solubiliser des membranes de SR (Picard et al. 2004). Je résumerai ensuite une deuxième étude (Picard et al. 2005a, *article accepté dans Biochemistry*) dont le but était de revenir sur les zones d'ombres des résultats publiés en 2000, pour les expliquer et tenter d'y remédier en comparant différents amphipols. Nous avons débouché notamment sur une proposition d'explication générale pour l'effet inhibiteur réversible que les amphipols exercent sur l'ATPase-Ca²⁺ (mais pas sur certaines autres protéines membranaires) en contre-partie de leur effet protecteur vis-à-vis d'une dénaturation irréversible.

1. Protection des membranes de réticulum contre leur floculation (Manuscrit # 5)

1.1. Introduction

La capacité des polymères amphiphiles (et plus généralement des surfactants) à solubiliser les membranes dépend de nombreux facteurs (Thomas and Tirrell 1992; Tribet 1998). Les amphipols synthétisés à Paris sont médiocrement efficaces sur des membranes lipidiques (Ladavière et al. 2001; Ladavière et al. 2002; Vial et al. 2005), et semblent de mauvais agents solubilisant pour les membranes de réticulum sarcoplasmique (Champeil et al. 2000). Pourtant, d'autres types de polymères amphiphiles, dérivés du pullulane, ont été décrits comme étant efficaces pour solubiliser des membranes bactériennes (Duval-Terrié et al. 2003). Ces derniers polymères sont des dérivés amphiphiles d'un polysaccharide, le pullulane (ce qui leur confère l'avantageuse propriété d'être biodégradables, d'où leur dénomination parfois d'« amphibiopols »), auquel sont greffées des chaînes décyles ($-(CH_2)_9-CH_3$) hydrophobes. Le pullulane modifié que nous avons étudié porte 18 % de chaînes hydrocarbonées, il a été baptisé 18C₁₀. Nous avons voulu mesurer en parallèle la capacité de ces deux types de polymères, amphipol A8-35 « classique » ou pullulane modifié, à solubiliser ou non des membranes de réticulum sarcoplasmique.

18C₁₀ : 91% de COO⁻ dont 18% greffés à des chaînes hydrocarbonées

$\langle m \rangle = 30$ kDa

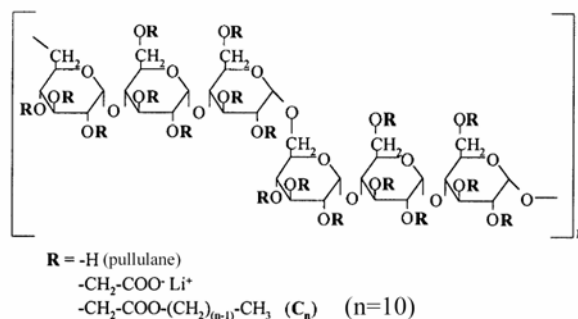


Figure 1. Formule du pullulane modifié, d'après (Duval-Terrié et al. 2003)

1.2. Résultats et discussion

Le moyen le plus simple pour déterminer la capacité de certains surfactants à solubiliser des membranes consiste à suivre les éventuelles variations de turbidité de ces membranes à la suite de l'addition du surfactant. Pour cela, un spectromètre d'absorption peut faire l'affaire : les spectres mesurés contiennent des informations à la fois sur l'absorption vraie des protéines, dans l'ultra violet, et sur la simple turbidité, dans le reste du spectre (Figure 2).

Ainsi, dans l'expérience contrôle présentée Figure 2 Panneau C, nous avons ajouté une concentration de C₁₂E₈ (un détergent non-ionique classique) connue pour être solubilisante (2 mg/ml) à des vésicules de SR suspendues à la concentration de 1 mg/ml dans 50 mM de Tes-Tris à pH 7,5 (20°C), KCl 100 mM, Mg²⁺ 1 mM, Ca²⁺ 0,1 mM. La turbidité du mélange a été évaluée après dilution d'un facteur 20 dans le même tampon sans détergent. Les

changements de la densité optique sont caractéristiques (comparer les courbes « jour 0 » et « + C₁₂E₈ »): lorsqu'on ajoute le détergent, la turbidité due à la diffusion de lumière par les vésicules membranaires (les vésicules de SR ont une taille de l'ordre de 60 à 200 nm de diamètre) disparaît, et il ne reste que l'absorption UV des résidus aromatiques de la protéine, vers 280 nm. Au contraire, quand les membranes ont été suspendues dans le même tampon, mais que l'on s'abstient d'ajouter du détergent (dans le Panneau C, courbes « jour 1, 2, 4 »), la turbidité augmente régulièrement au cours du temps, phénomène que l'on attribue à l'agrégation des vésicules les unes avec les autres, leur « floculation », qui donne à la suspension un aspect floconneux.

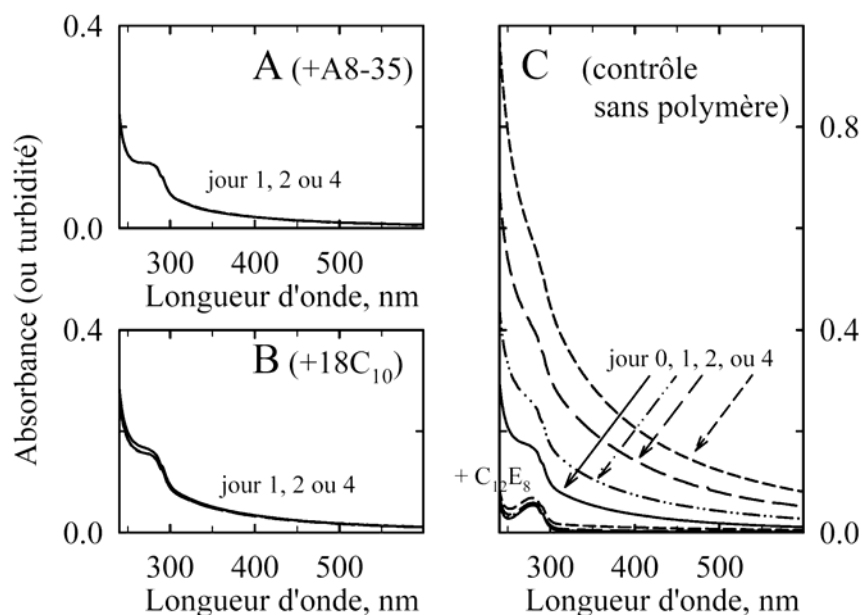


Figure 2. Spectres d'absorption et de turbidité de SR, préincubé à 1 mg/ml en présence ou en absence de polymère amphiphile (A8-35 ou 18C₁₀) ou de C₁₂E₈ à 2 mg/ml, et dilué 20 fois.

Lorsqu'on réalise la même incubation en présence d'A8-35 (Panneau A) ou de 18C₁₀ (Panneau B), tous deux à la même concentration de 2 mg/ml, nous n'observons pas de solubilisation, même sur quatre jours. A vrai dire ce résultat, pour le A8-35, était connu sur le court terme (Champeil et al, 2000), mais nous voulions voir s'il y avait un effet solubilisateur sur le long terme. En revanche, pour le 18C₁₀, ce résultat était plus inattendu, puisque ce pullulane modifié a des propriétés solubilisantes vis à vis de certaines membranes bactériennes (Duval-Terrié et al. 2003). Il semblerait donc que ce résultat soit l'illustration de ce que nous mentionnions en introduction: un même détergent solubilise avec plus ou moins de succès différents types de membranes. Il a par exemple été montré que la composition en lipides et en cholestérol jouait un rôle important dans la résistance de certaines membranes à la solubilisation (Schuck et al. 2003).

Mais en outre, ces résultats révèlent une propriété inattendue: si la présence de ces polymères ne permet pas la solubilisation, elle semble bien éviter le phénomène de floculation que nous avons vu dans notre expérience contrôle (Panneau C). En effet, en présence de l'un ou l'autre polymère, la turbidité de nos suspensions membranaires ne varie plus au cours du temps (les courbes obtenues après 1, 2 ou 4 jours d'incubation en chambre froide sont superposables). En parallèle, nous avons mesuré l'activité ATPasique résiduelle de ces membranes après plusieurs jours (résultat non présenté), et il apparaît que les membranes qui ont été incubées en présence d'une certaine quantité de polymère ont une activité enzymatique résiduelle significativement plus élevée que celles incubées en absence de polymère (à ce

sujet, notons qu'il semble préférable, pour conserver une activité ATPasique optimale, d'incuber le pullulane modifié à une concentration un peu plus faible que celle présentée Figure 2, par exemple à 0,4 mg/ml au lieu de 2 mg/ml).

Nous attribuons cette protection contre la floculation au fait qu'en s'adsorbant à la surface des membranes, les polymères forment sans doute une couronne hydrophile autour des vésicules, qui va minimiser les phénomènes d'agrégation. Cette interprétation n'est pas sans rappeler le rôle joué par la gomme arabique dans l'encre des anciens scribes : maintenir en solution les grains de carbone hydrophobes en leur évitant de s'agréger et donc de tomber au fond de l'encrier (de Gennes and Badoz 1994; Currie et al. 2003). Cette propriété (initialement non recherchée) des amphipols n'est peut-être pas sans intérêt : elle pourrait être utile pour le maintien en solution de protéines membranaires pendant de relativement longues périodes.

2. Effet de différents amphipols sur l'ATPase- Ca^{2+} : protection ou inhibition ? (Manuscrit # 6)

2.1. Introduction

Même si l'utilisation des polymères amphiphiles requiert la présence de détergent pour l'étape préliminaire de solubilisation des membranes, ces molécules semblent être des outils prometteurs pour la manipulation de protéines membranaires en solution. Nous avons déjà dit que les propriétés de leur représentant le plus activement étudié, le A8-35, avaient été testées dans divers systèmes biologiques, et que dans de nombreux cas un effet protecteur avait été mis en évidence (Tribet et al., 1996). Depuis, les protocoles de synthèse ont été optimisés du point de vue chimique, et de nouveaux polymères ont été synthétisés: des amphipols zwitterioniques (PMAL-C12, Figure 3C) et des versions sulfonées de ces amphipols (SAPol et PMALA-C12, Figures 3B et 3D). Ces amphipols sulfonés proviennent respectivement du laboratoire de nos collègues parisiens à l'IBPC et de la société Anatrace, qui commercialise également les amphipols zwitterioniques (PMALAC12).

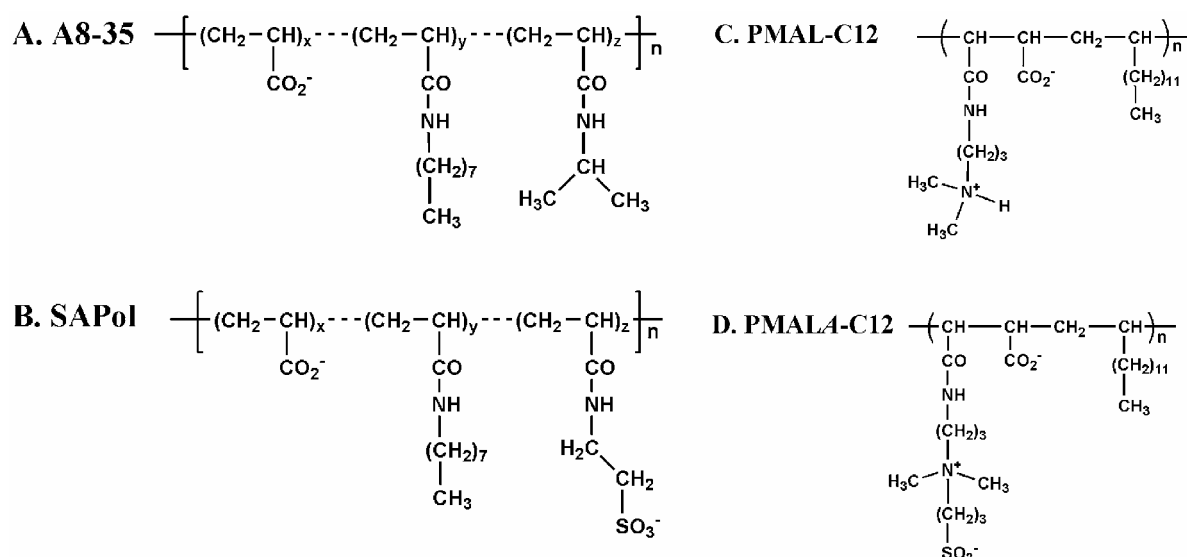


Figure 3. Formules chimiques des différents amphipols étudiés

Nous avons aussi déjà indiqué plus haut que les résultats publiés en 2000 d'une étude détaillée de l'effet des amphipols sur l'ATPase- Ca^{2+} étaient quelque peu ambivalents (Champeil et al. 2000). En effet, ils montraient que le A8-35 avait certes des effets bénéfiques concernant la protection de l'ATPase, mais cet amphipol présentait aussi le désagréable inconvénient de s'agréger de manière irréversible dans certaines conditions, et d'inhiber de façon réversible l'activité ATPasique de SERCA. Nous avons voulu comprendre dans quelle mesure ces effets négatifs pouvaient être circonscrits. Pour cela nous avons d'abord étudié l'influence de la composition de la solution sur la tendance à l'agrégation du A8-35 seul: nous discuterons dans une première partie de la raison -désormais évitable- pour laquelle ces phénomènes d'agrégation avaient été observés dans l'étude précédente. Nous avons ensuite focalisé notre travail sur la comparaison de différents amphipols, du point de vue de l'inhibition réversible de l'activité ATPasique. Cette inhibition de l'ATPase était paradoxale puisque d'autres études suggéraient que des enzymes membranaires différentes étaient stabilisées par les amphipols sans conséquence fâcheuse pour leur activité catalytique.

2.2. Préliminaires : effet des ions divalents sur l'agrégation de l'amphipol seul en solution

Notre premier objectif, avant toute autre chose, a été de comprendre pourquoi le A8-35 étudié en 2000 avait révélé une tendance aussi fâcheuse à l'agrégation. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des chromatographies sur tamis moléculaire et étudié si les tampons utilisés pouvaient avoir été la cause de cette agrégation.

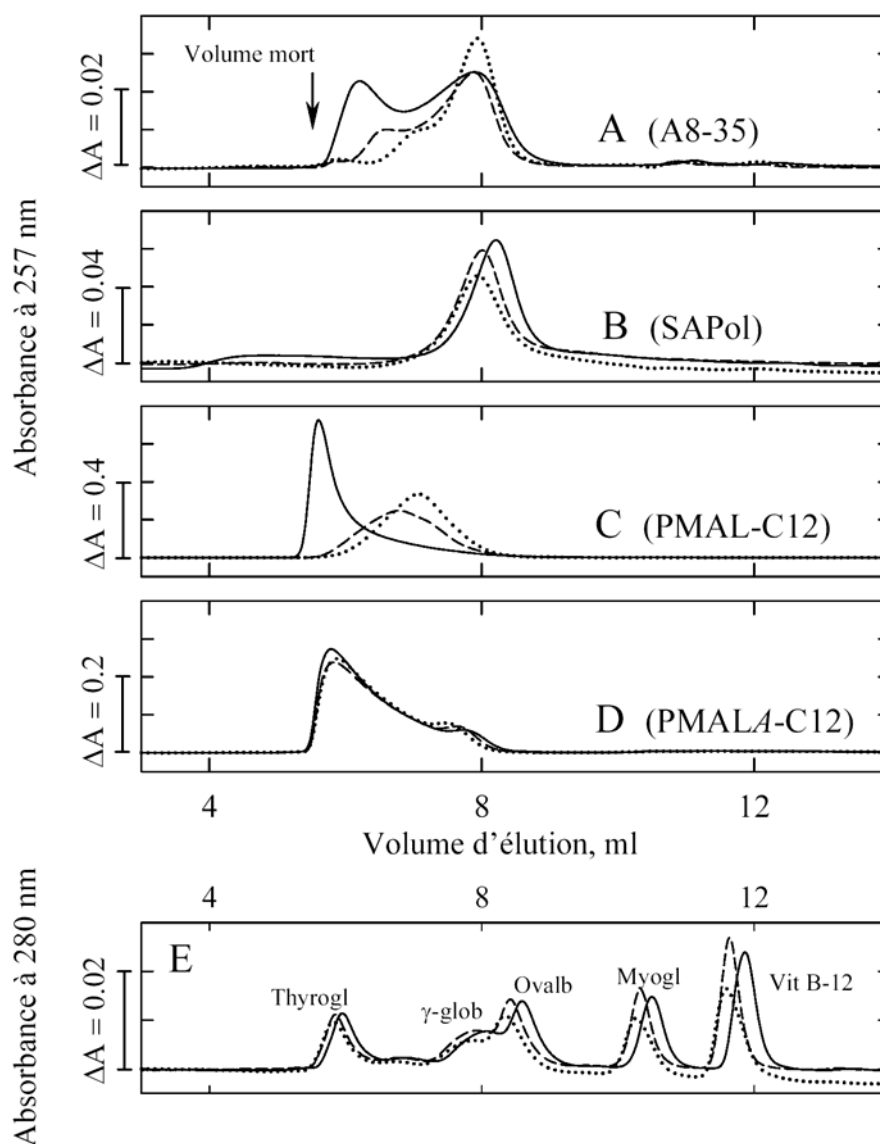


Figure 4. Profils d'élution des agrégats d'amphipols, vus par chromatographie sur tamis moléculaire en présence de concentrations croissantes de Ca^{2+} ou de Mg^{2+} (voir texte)

Les profils visibles sur la Figure 4 représentent les profils d'élution (sur une colonne TSK 3000SW) de nos différents amphipols dans un tampon KCl 100 mM et Tes-NaOH 20 mM (pH 7 et 23°C) dans lequel on a imposé différentes concentrations de Ca^{2+} libre et/ou de Mg^{2+} . Les profils représentés en pointillés correspondent à des éluions en absence d'ion divalent (en présence de 0,5 mM d'EDTA ; Ca^{2+} et Mg^{2+} sont alors chélatés), les traces représentées par des traits discontinus correspondent à une élution en présence de 1 mM de Mg^{2+} seul (en présence d'EGTA, qui chélate le Ca^{2+}), et les traits pleins correspondent à une élution en présence de 1 mM de Mg^{2+} et de 0,5 mM de Ca^{2+} . En absence de tout divalent, le profil de l'amphipol A8-35 est presque monodisperse (pointillés du

panneau A) et par comparaison avec les standards d'élution représentés Panneau E, on constate que cette élution correspond à la migration de particules de rayon hydrodynamique de 3 nm (rayon de Stokes), ce qui est cohérent avec ce qui a été suggéré par d'autres techniques (Gohon et al. 2004). La présence de Ca^{2+} (tracé continu), et dans une moindre mesure la présence de Mg^{2+} (tracé interrompu), induit une agrégation très significative d'une fraction de l'amphipol A8-35, qui est maintenant élué beaucoup plus près du volume mort.

Notons au passage qu'en présence de 0,5 mM Ca^{2+} , un amphipol A8-35 synthétisé comme dans l'étude de 2000 est élué encore plus largement dans le volume mort de la colonne, et donc s'agrége encore plus, mais l'agrégation de ces lots-là est elle aussi diminuée lorsque la concentration de calcium était maintenue suffisamment basse. La différence entre les divers lots de A8-35 provient du fait que le protocole de synthèse du A8-35 a désormais été amélioré: les anciens lots d'amphipol n'étaient pas complètement purs, et une petite fraction des chaînes présentait un greffage artéfactuel d'un agent chimique utilisé pendant la synthèse, le dicyclohexylcarbodiimide. Cette question de synthèse chimique réglée, il reste la question de la présence de Ca^{2+} dans le milieu. Mais c'était pour de bonnes raisons que les tampons de l'étude de 2000 contenaient du calcium: comme on l'a dit à propos des protocoles de cristallisation, l'ATPase- Ca^{2+} est très instable en présence de détergent et en absence de Ca^{2+} , et les tampons de stockage doivent donc *a priori* contenir des concentrations de Ca^{2+} relativement élevées. L'utilisation de l'amphipol A8-35 n'est donc pas, de ce point de vue là, très recommandée pour maintenir monodisperse l'ATPase Ca^{2+} en la seule présence d'un amphipol.

Nous avançons deux interprétations pour rendre compte de cet effet d'agrégation en présence de Ca^{2+} . D'abord un pontage entre groupements carboxyliques de deux chaînes d'amphipols différents (et aussi bien sûr au sein d'une même molécule d'amphipol). Mais une autre explication, qui n'est d'ailleurs pas incompatible avec la précédente, serait le simple écrantage électrostatique par le calcium des charges négatives du squelette de l'amphipol. En effet les amphipols ont été imaginés de manière à ce que les carboxyles du squelette puissent former une interface chargée négativement autour des segments transmembranaires: c'est cette interface hydrophile qui va éviter que les chaînes hydrophobes greffées sur le squelette ne se regroupent en une seule phase grasse. Nous privilégions la première hypothèse (effet spécifique du Ca^{2+} par pontage entre chaînes latérales) car l'effet du Mg^{2+} (qui *a priori* a la même capacité à écranter électrostatiquement les charges négatives) est moins marqué que l'effet du Ca^{2+} , mais la seconde doit jouer aussi car une concentration élevée de KCl peut aussi aboutir à semblable agrégation. L'amphipol zwitterionique commercial (Panneau C) présente la même tendance mais de manière encore plus prononcée. L'amphipol sulfonaté commercial est agrégé même en absence d'ion divalent, sans doute pour des raisons de contamination par des résidus de synthèse, comme pour nos anciens lots A8-35. En revanche, le cas de l'amphipol sulfonaté dérivé de l'A8-35 est particulièrement intéressant, car son profil d'élution est quasiment monodisperse quelles que soient les conditions (nous avons montré par une approche différente que ceci restait vrai même en présence de 30 mM de Ca^{2+} , résultats non montrés ici, voir Picard et al. 2005a, à la fin de ce chapitre). L'utilisation du SAPol pourrait donc être d'une très grande aide pour toutes les enzymes nécessitant des concentrations de Ca^{2+} supérieures à quelques micromolaires.

2.3. Effet de différents amphipols sur l'activité ATPasique de SERCA1a

Il avait déjà été montré, grâce à la méthode de mesure d'hydrolyse d'ATP dont le principe est expliqué au chapitre Matériel et Méthodes (dosage par enzymes couplées), que la présence d'amphipol A8-35 inhibait réversiblement le fonctionnement de l'ATPase- Ca^{2+} .

Nous avons reproduit cette observation avec du A8-35 synthétisé à l'IBPC selon le nouveau protocole, puis avons répété l'expérience en présence des différents polymères qui nous intéressent ici.

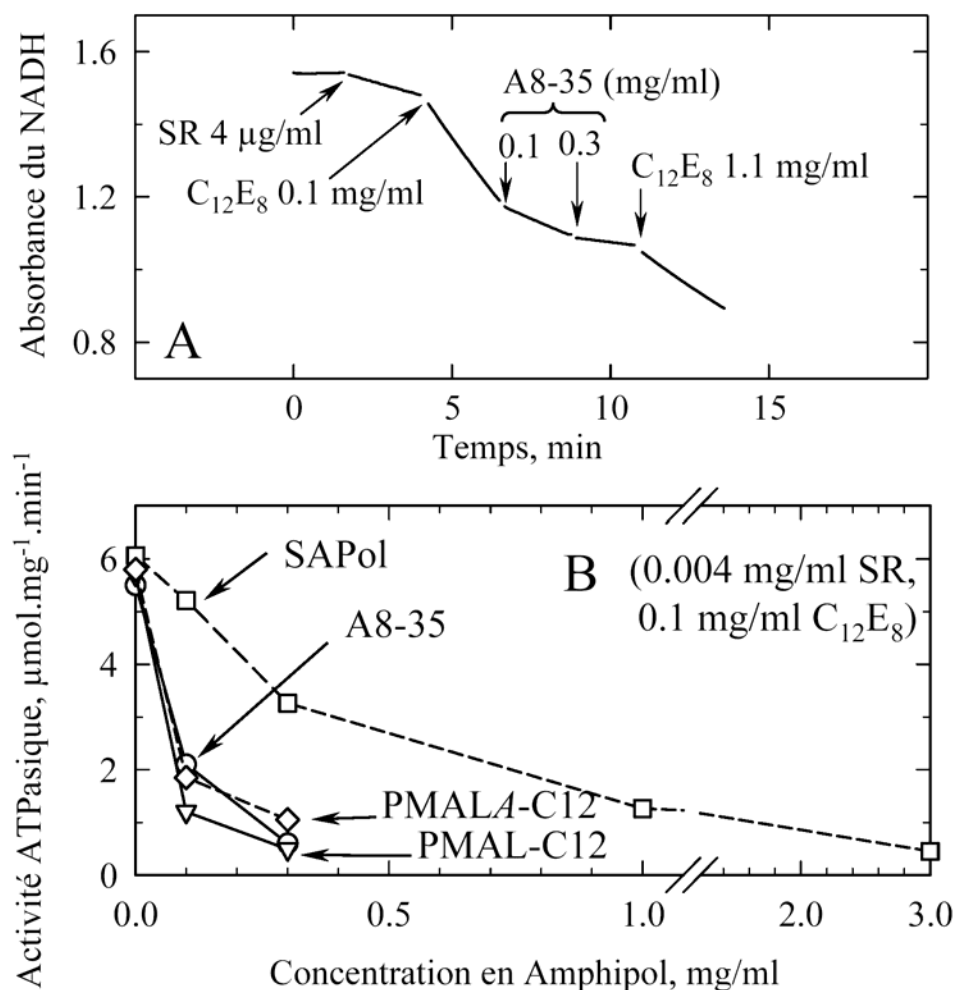


Figure 5. Effet des différents amphipols sur l'activité enzymatique de SERCA

Nous montrons sur la Figure 5A un tracé-type, obtenu dans le cas du A8-35. Lorsqu'on ajoute l'enzyme au milieu de mesure, au début de l'expérience, l'activité ATPasique démarre, comme en témoigne la diminution d'absorbance du NADH au cours du temps. Toutefois cette activité ne devient optimale que lorsqu'on ajoute une concentration solubilisante de détergent, car l'activité de transport était précédemment inhibée par la forte concentration de Ca^{2+} luminal qui découle de l'activité de transport de la pompe. Si à ce moment-là on ajoute des quantités croissantes d'A8-35, l'activité ATPasique est ralentie. Mais cette inhibition est réversible, car si on ajoute enfin une concentration beaucoup plus grande de détergent, l'activité redémarre. Cette réversibilité est sans doute due au fait qu'en présence de micelles de détergents, l'amphipol se décroche de l'ATPase pour partitionner dans les micelles de détergent. Cette propriété avait déjà été mise en évidence dans (Champeil et al. 2000) pour l'ancienne préparation d'amphipol ; nous montrons ici que ce résultat est toujours vrai pour l'amphipol synthétisé suivant le nouveau protocole. Nous avons réalisé la même expérience avec les différents amphipols, et reporté sur le Panneau B les résultats de ces mesures. Tous les polymères amphiphiles ont qualitativement la même tendance à inhiber l'activité. Il est clair cependant que pour la version sulfatée du A8-35, le SAPol, on a besoin de concentrations plus élevées pour inhiber l'activité ATPasique de la même façon.

2.4. Effet protecteur des différents amphipols vis-à-vis de la dénaturation irréversible de l'ATPase solubilisée, lors de son incubation dans un milieu dépourvu de Ca^{2+}

Comme nous avons eu l'occasion de le mentionner à plusieurs reprises, l'ATPase- Ca^{2+} est particulièrement instable en présence de détergent et en absence de Ca^{2+} ; l'amphipol A8-35 présente le précieux avantage de protéger l'ATPase dans de telles conditions. Ceci peut être aisément mis en évidence en incubant l'ATPase (ici à 0,4 mg/ml) en présence d'une concentration solubilisante de détergent C_{12}E_8 (1 mg/ml) en présence ou en absence d'A8-35, dans un tampon Mops-Tris 50 mM (pH 7, 23°C), KCl 100 mM, Ca^{2+} 0,02 mM et EGTA 1 mM. La concentration de Ca^{2+} libre dans ce milieu est extrêmement basse. Après incubation pendant des temps choisis, des aliquotes de 20 μl de ce mélange sont diluées dans 2 ml du milieu de dosage ATPasique (décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes), auquel 1 mg/ml de C_{12}E_8 a été ajouté afin de réverser toute inhibition par l'amphipol qui serait réversible (cf précédemment) et révéler ainsi la fraction d'ATPase qui n'a pas été dénaturée de façon irréversible. L'activité ATPasique est alors mesurée. Nous avons répété de semblables mesures avec les autres amphipols.

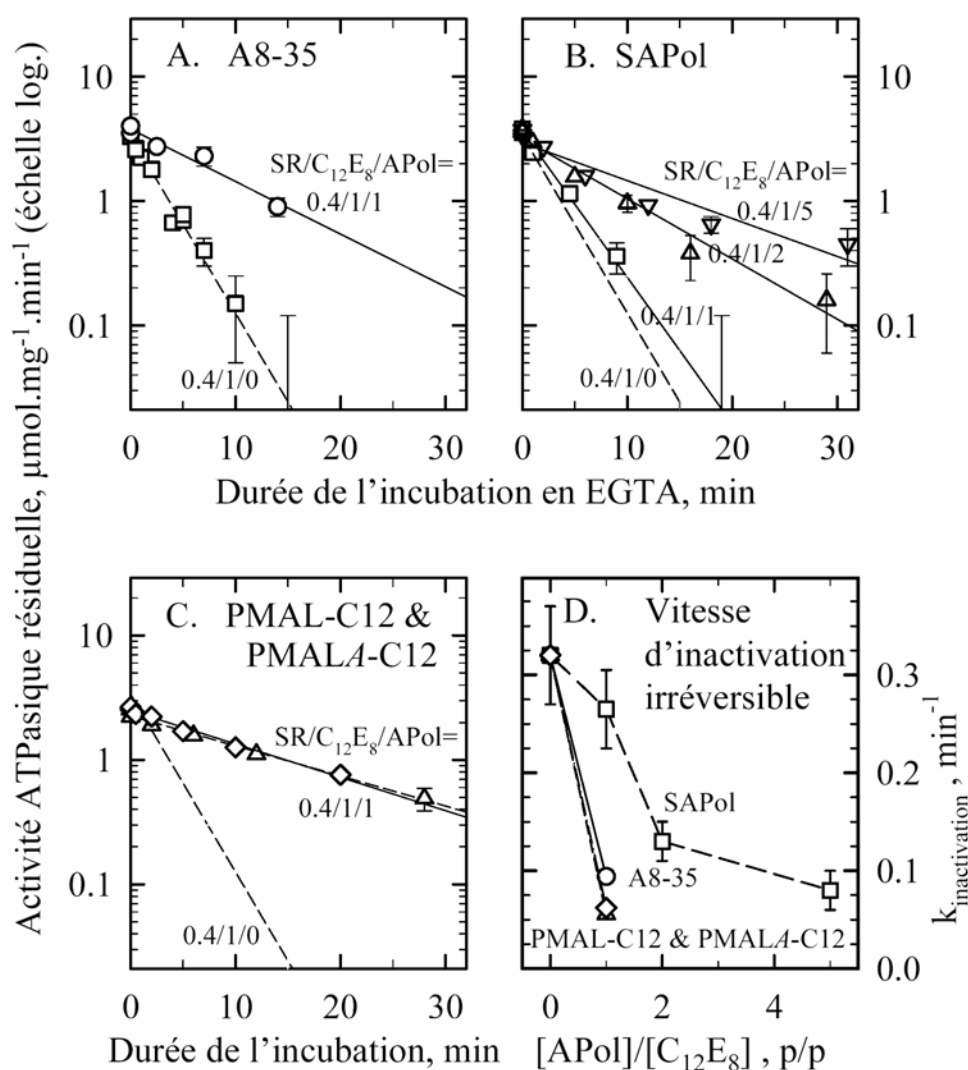


Figure 6. Protection conférée par les différents amphipols contre la dénaturation irréversible de l'ATPase lors de son incubation dans un milieu dépourvu de Ca^{2+}

L'activité ATPasique résiduelle de l'ATPase solubilisée incubée en absence d'amphipol chute après quelques minutes d'incubation (Figure 6, Panneau A, symboles carrés). En revanche, lorsque l'ATPase solubilisée est incubée en présence d'amphipol A8-35 (1 mg/ml, pour 1 mg/ml de $C_{12}E_8$), l'inactivation irréversible de l'ATPase est fortement ralentie. Il en est de même avec les autres amphipols. Les amphipols commerciaux ont la même tendance vis-à-vis de la protection, aux mêmes doses que le A8-35 (par exemple à un rapport amphipol:détergent = 1:1). En revanche, l'amphipol sulfonaté SAPol n'est aussi efficace qu'à concentration plus élevée (5 mg/ml pour 1 mg/ml de $C_{12}E_8$).

2.5. Effet protecteur des différents amphipols vis-à-vis de la dénaturation irréversible de l'ATPase lors de sa dilution dans un milieu dépourvu de détergent

En suivant le même type de protocole, nous avons ensuite étudié l'effet d'une forte dilution, dans un milieu dépourvu de détergent, de l'ATPase initialement solubilisée. Comme la plupart des protéines membranaires, l'ATPase- Ca^{2+} se dénature irréversiblement dès que ses segments transmembranaires hydrophobes se trouvent au contact direct du milieu aqueux.

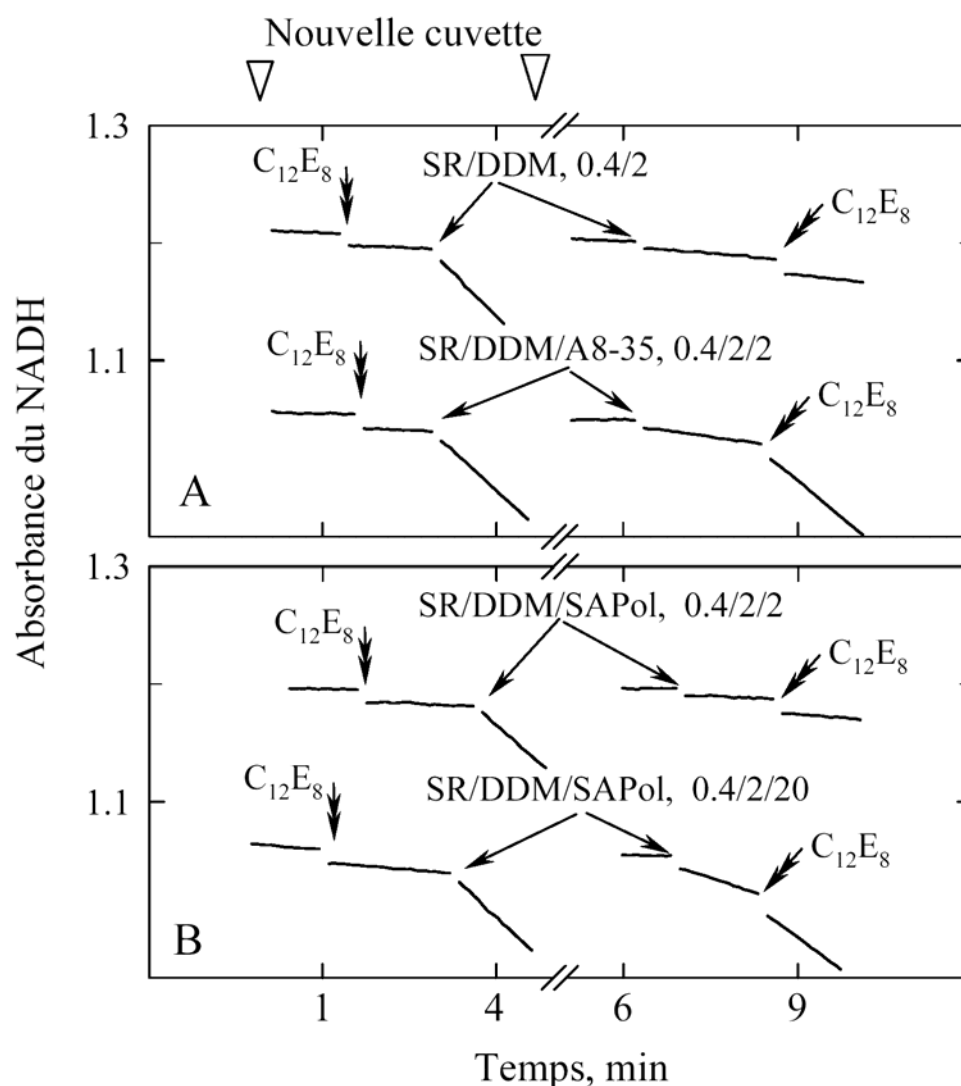


Figure 7. Protection conférée par les différents amphipols contre la dénaturation irréversible de l'ATPase lors de sa forte dilution dans un milieu dépourvu de détergent

Pour cette expérience, nous avons solubilisé des membranes de SR en présence de dodécylmaltoside (DDM à 2 mg/ml) dans un tampon Tes-Tris 25 mM (pH 7,5 23°C), KCl 100 mM, Mg^{2+} 0,5mM, Ca^{2+} 0,05 mM. Après 15 à 60 minutes, ce mélange a été dilué dans une solution de dosage ATPasique (cf Matériel et Méthodes) contenant du détergent (traces de gauche) ou non (traces de droite). Dans le premier cas, l'ATPase se trouve dans son milieu optimal de dosage d'activité ATPasique : l'hydrolyse de l'ATP est comparable à ce que l'on voyait Figure 5A. En revanche, lorsque le milieu de dosage ne contient pas de détergent, l'activité d'hydrolyse est inhibée, et ce de manière irréversible car l'ajout de détergent ne change plus rien.

Nous avons réalisé le même test après avoir préalablement incubé l'ATPase en présence d'A8-35. Dans ces conditions, la dilution dans le milieu de dosage contenant du détergent a le même résultat témoin que précédemment. Lorsqu'on dilue dans un milieu contenant du $C_{12}E_8$, l'activité reste encore assez faible (l'ATPase complexée au seul amphipol n'hydrolyse pas très vite son substrat). En revanche, contrairement à ce qu'on voyait précédemment, l'ajout ultérieur de détergent permet alors de retrouver une activité quasi-maximale: l'amphipol A8-35 protège donc efficacement contre la dénaturation irréversible lors de la dilution en absence de détergent.

Nous avons répété cette expérience en présence des amphipols commerciaux, avec le même résultat (résultat non montré), et également avec l'amphipol sulfonaté SAPol : dans ce dernier cas, de nouveau, la même efficacité de protection a été retrouvée, mais à des doses beaucoup plus élevées: il est nécessaire d'ajouter 10 fois plus de SAPol que de A8-35 pour obtenir la même protection (voir Panneau B).

2.6. Une expérience clef ? Effet des amphipols sur une étape particulière, la dissociation du calcium

Nous avons montré qu'il semble exister une corrélation entre la protection de l'ATPase vis-à-vis de son inactivation irréversible et l'inhibition réversible de son activité par les différents amphipols. Pour poursuivre l'exploration de cette corrélation *a priori* inattendue, nous nous sommes intéressés à une étape particulière du cycle catalytique, la dissociation des ions Ca^{2+} du côté cytosolique (qui ne joue aucun rôle limitant pour l'hydrolyse de l'ATP puisqu'elle n'intervient que lorsque le cycle fonctionne à l'envers). Les données structurales suggèrent que cette dissociation nécessite une réorganisation conformationnelle significative de la protéine: en effet les structures cristallographiques de l'ATPase en présence ou en absence de Ca^{2+} ne révèlent aucun accès ouvert permettant que les ions Ca^{2+} atteignent leurs sites de fixation. Nous avons voulu tester si la présence d'amphipol pouvait perturber ces événements.

La cinétique de dissociation des ions Ca^{2+} du côté cytosolique a été suivie au « stopped-flow », comme on l'a vu dans le chapitre Matériel et Méthodes ainsi que lors de précédentes études (cf Chapitre V, première partie).

Dans une expérience contrôle (Figure 8), nous avons incubé 0,4 mg/ml de SR dans un tampon Mops-Tris 50 mM et KCl 100 mM (pH 7, 20°C) additionné de 1 mg/ml de $C_{12}E_8$. Cette solution est mélangée volume à volume avec du quin2, à la concentration de 400 μ M dans le même tampon que le SR additionné cette fois de seulement 50 μ g/ml de $C_{12}E_8$ (c'est à dire à peu près la concentration micellaire critique (CMC) du $C_{12}E_8$. La fluorescence du quin2 est alors suivie avec une longueur d'onde de 312 nm à l'excitation et en disposant un filtre vert (MTO DA541) à l'émission. Le signal de fluorescence a une cinétique monophasique

(cf Introduction) dont la constante de vitesse est du même ordre de grandeur que celle obtenue par ailleurs en absence de détergent (signaux non représentés ici).

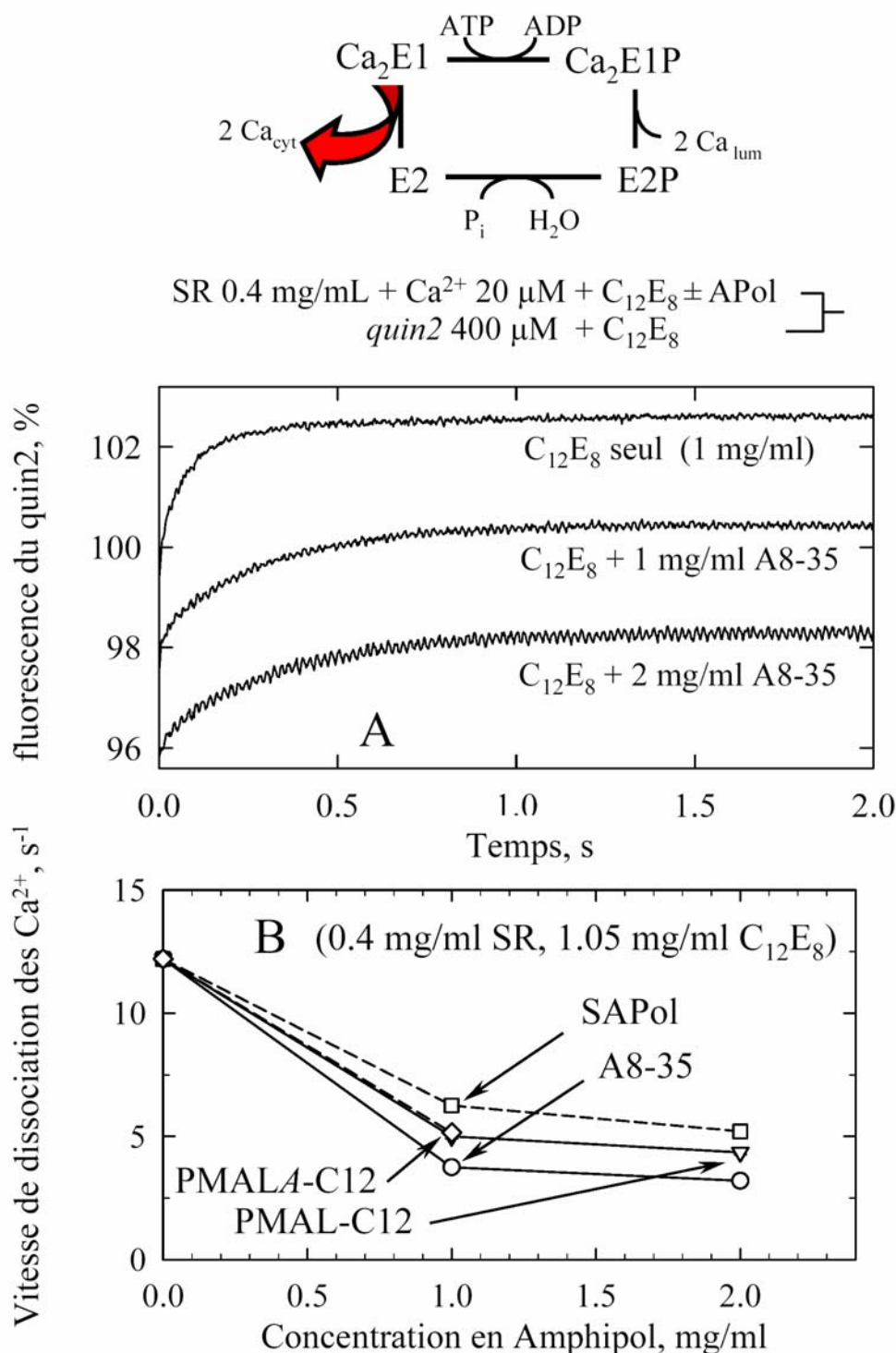


Figure 8. Effet des amphipols sur une étape particulière du cycle, la dissociation des ions Ca^{2+} de leurs sites vers le côté cytosolique.

La Figure 8 montre que lorsqu'on a préalablement incubé les vésicules en présence d'amphipol (tous les amphipols ont été testés à la concentration de 1 ou 2 mg/ml), la cinétique de dissociation est ralentie. Une fois encore, c'est en présence de SAPol qu'il faut le plus d'amphipol pour observer un même ralentissement.

2.7. Conclusions

Nous avons montré que la présence d'ions divalents, et plus spécialement la présence de Ca^{2+} , est défavorable au maintien de l'amphipol A8-35 sous forme de « micelles » raisonnablement monodisperses. Ce résultat n'empêche pas que l'utilisation de ce polymère reste tout à fait pertinente pour l'étude de protéines ne nécessitant pas des concentrations trop fortes de Ca^{2+} : pour les protéines pouvant être conservées dans un milieu de type « cytosolique » (Ca^{2+} sub-micromolaire), l'emploi de cet amphipol reste approprié. Pour les protéines comme l'ATPase- Ca^{2+} pour lesquelles le maintien en présence d'une concentration de Ca^{2+} élevée est parfois indispensable, ce problème d'agrégation peut être évité en utilisant l'amphipol sulfonaté SAPol.

L'étude comparative de l'effet des différents amphipols suggère par ailleurs que protection et inhibition d'activité sont étroitement liées. De plus nous avons montré que ces deux effets étaient également corrélés (quoique pas très fortement, il est vrai) au ralentissement que ces polymères exercent sur la vitesse à laquelle les Ca^{2+} se dissocient de leurs sites de fixation, vers le milieu cytosolique. Nous pensons que ces différents résultats peuvent être compris comme révélant un effet des polymères baptisé « effet Gulliver », en relation avec les péripéties du héros de Jonathan Swift au royaume de Lilliput (Swift 1726). A l'image de Gulliver qui était dans l'incapacité de se dégager de l'emprise des centaines de cordelettes qui le retenaient au sol, bien que chacune soit bien fragile, nous imaginons que l'attachement multipoint des chaînes latérales de l'amphipol autour des segments transmembranaires de la protéine ralentit les « respirations » de l'ATPase. Ce sont les mouvements de trop grande amplitude des segments transmembranaires de l'ATPase qui sont susceptibles de la faire basculer irréversiblement dans une configuration dénaturée, et de ce point de vue, toute restriction à ces mouvements contribue à stabiliser l'ATPase. Mais simultanément, ces respirations sont aussi nécessaires à l'accès des ions Ca^{2+} à leur site ou à leur départ, et plus généralement sans doute à certaines des étapes du cycle catalytique, qui se trouve donc ralenti -mais de façon réversible- par l'attachement multipoint du polymère. L'attrait de cette interprétation est qu'elle nous permet aussi de comprendre comment les amphipols pourraient à la fois inhiber notre protéine de transport préférée mais laisser intacte l'activité d'autres protéines membranaires, telles que le récepteur à l'acétylcholine (Martinez et al. 2002) ou la diacylglycérol kinase (Gorzelle et al. 2002), et plus généralement laisser intacte l'activité de celles parmi les protéines membranaires qui ne nécessitent pas, pour fonctionner, de telles respirations, de telles augmentations transitoires de leur section transmembranaire.

Manuscrit # 5:

Stabilization of membranes upon interaction of amphipathic polymers with membrane proteins.

Picard, M., Duval-Terrié, C., Dé, E., and Champeil, P. (2004)

Protein Science 13, 3056-3058.

FOR THE RECORD

Stabilization of membranes upon interaction of amphipathic polymers with membrane proteins

MARTIN PICARD,¹ CAROLINE DUVAL-TERRIÉ,² EMMANUELLE DÉ,² AND
PHILIPPE CHAMPEIL¹

¹Unité de Recherche Associée 2096 (Centre National de la Recherche Scientifique et Commissariat à l'Energie Atomique) & Section de Biophysique des Fonctions Membranaires, Département de Biologie Joliot-Curie, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France, and Laboratoire de Recherche Associé 17V & Institut Fédératif de Recherches 46, Université Paris Sud, France

²Unité Mixte de Recherche 6522 (Centre National de la Recherche Scientifique), Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan cedex, France

(RECEIVED July 1, 2004; FINAL REVISION July 1, 2004; ACCEPTED July 26, 2004)

Abstract

Amphipathic polymers derived from polysaccharides, namely hydrophobically modified pullulans, were previously suggested to be useful as polymeric substitutes of ordinary surfactants for efficient and structure-conserving solubilization of membrane proteins, and one such polymer, 18C₁₀, was optimized for solubilization of proteins derived from bacterial outer membranes (Duval-Terrié et al. 2003). We asked whether a similar ability to solubilize proteins could also be demonstrated in eukaryotic membranes, namely sarcoplasmic reticulum (SR) fragments, the major protein of which is SERCA1a, an integral membrane protein with Ca²⁺-dependent ATPase and Ca²⁺-pumping activity. We found that 18C₁₀-mediated solubilization of these SR membranes did not occur. Simultaneously, however, we found that low amounts of this hydrophobically modified pullulan were very efficient at preventing long-term aggregation of these SR membranes. This presumably occurred because the negatively charged polymer coated the membranous vesicles with a hydrophilic corona (a property shared by many other amphipathic polymers), and thus minimized their flocculation. Reminiscent of the old Arabic gum, which stabilizes Indian ink by coating charcoal particles, the newly designed amphipathic polymers might therefore unintentionally prove useful also for stabilization of membrane suspensions.

Keywords: membrane protein; solubilization; amphiphilic polysaccharide; pullulan; sarcoplasmic reticulum; corona

Amphipathic linear polymers, with randomly distributed polar groups and nonpolar side chains, were proposed to be

useful tools for the handling of membrane proteins in isolated form, thanks to multipoint attachment of the polymer nonpolar side chains onto the transmembrane protein hydrophobic surface (Tribet et al. 1996; Popot et al. 2003). The ability of such amphipathic polymers to directly solubilize membranes, however, is dependent on a number of factors (e.g. Thomas and Tirrell 1992; Tribet 1998 and references herein). For instance, although certain polyacrylate-based amphipathic polymers have been shown to efficiently keep membrane proteins soluble *after* their extraction from membranes by detergents, they proved to be poor membrane solubilizers *per se* (e.g., Champeil et al. 2000; Nagy et al. 2001; Ladavière et al. 2002); in contrast, other

Reprint requests to: Martin Picard, Unité de Recherche Associée 2096 (Centre National de la Recherche Scientifique et Commissariat à l'Energie Atomique) & Section de Biophysique des Fonctions Membranaires, Département de Biologie Joliot-Curie, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex, France; e-mail: picard@dsvidf.cea.fr; fax: +33-1-6908-8139.

Abbreviations: SR, sarcoplasmic reticulum; ATPase, adenosine triphosphatase; 18C₁₀, hydrophobically modified carboxymethylpullulan (see Duval-Terrié et al. 2003); A8-35, hydrophobically modified polyacrylic acid in its sodium form (see Tribet et al. 1996); TES, N-tris[hydroxymethyl]-methyl-2-aminoethane-sulfonic acid.

Article published online ahead of print. Article and publication date are at <http://www.proteinscience.org/cgi/doi/10.1110/ps.04962104>.

amphipathic polymers were reported to be endowed with significant efficiency for the solubilization of membrane proteins: This was the case for hydrophobically modified pullulans, when added to bacterial outer membrane proteins (e.g., Duval-Terrié et al. 2003). To allow for comparison of the properties of the two classes of polymer on the same biological material, we complemented our initial study of the ability of hydrophobically modified polyacrylate to solubilize sarcoplasmic reticulum (SR) membranes (Champeil et al. 2000) with the present study of the ability of a modified pullulan, 18C₁₀ (Duval-Terrié et al. 2003), to solubilize the same SR membranes.

Results and Discussion

In the absence of detergent, interaction with intact SR membranes of the modified pullulan 18C₁₀ does not solubilize these membranes but minimizes their time-dependent flocculation.

We asked whether incubation of intact SR membranes with the modified pullulan 18C₁₀ would lead to membrane solubilization in the absence of any detergent. To answer this question, we simply measured after dilution the turbidity of appropriate samples, incubated with modified pullulan for up to a few days. As shown in Figure 1, A or B, the spectrum of such samples reveals superimposition of both the expected UV absorption of the membrane proteins and the turbidity spectrum characteristic of light scattering by small particles (SR vesicles are known to be 60–200 nm in diameter). Over a 4-d incubation period of SR membranes with the modified pullulan, used either at a low (Fig. 1A) or a higher (Fig. 1B) concentration, this composite spectrum essentially did not change; this was also true (data not shown) in the case of SR membrane 4-d incubation with another charged and hydrophobically modified polymer, amphotol A8–35 (Tribet et al. 1996), derived from polyacrylate and previously studied over shorter periods with the same result (Champeil et al. 2000). The apparent discrepancy between the present results and those in Duval-Terrié et al. (2003), where different biological membranes were used, is probably simply another example of the well-known fact that different types of membranes are solubilized to different extents by a given surfactant (e.g., the microdomains known as “rafts” in plasma membranes, compared with the less specialized areas of the membrane; see Schuck et al. 2003). Originally, 18C₁₀ was, in fact, optimized with respect to specific solubilization of bacterial outer membranes.

The disappointing result that modified pullulan 18C₁₀ is not efficient for solubilization of SR membranes, however, regains interest upon comparison with what happened to SR membranes in the absence of polymer (Fig. 1C) in the same experiment: In the absence of detergent or polymer, the turbidity of the membranes increased to a large extent over

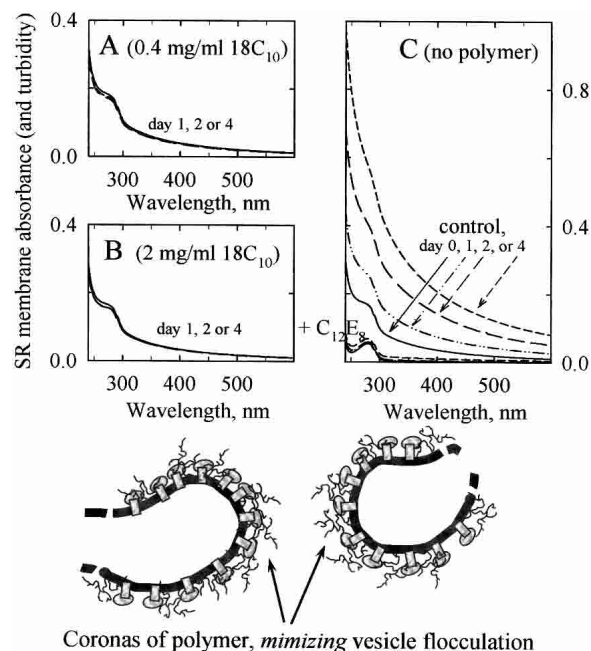


Figure 1. The modified pullulan 18C₁₀ does *not* solubilize SR membranes, but *prevents* their flocculation in the absence of detergent. SR membranes were suspended at 1 mg protein/mL in a buffer consisting of 100 mM KCl, 1 mM Mg²⁺, 0.1 mM Ca²⁺, and 50 mM Tes-Tris at pH 7.5 (at 20°C). An aliquot of this suspension was supplemented with 2 mg/mL C₁₂E₈ (C), while two other aliquots were supplemented with either 0.4 (A) or 2 mg/mL (B) of the modified pullulan 18C₁₀, in the absence of C₁₂E₈; the rest was kept as control (also shown in C). All samples were left in the cold room (at about 6°C). After various periods over 4 d (15 h, 39 h, or 89 h), 100 μ L of the different samples were diluted into 2 mL of the same buffer, and turbidity (and absorbance) properties were examined in the UV and visible region. (Bottom) Cartoon illustrating the suggested coronas of polymers, coating the membranes.

days, revealing an intrinsic tendency of the membranes for long-term aggregation or flocculation (in the presence of detergent, the typical UV absorbance of membrane proteins of course remained visible, but turbidity vanished, as expected; see bottom spectra in Fig. 1C). Thus, the modified pullulan, even at low concentration (1:2.5 w/w, relative to SR membranes), in fact efficiently *prevents* the intrinsic tendency for flocculation. After a whole week in the cold room, the residual ATPase activity of the membranes, as tested in the presence of excess C₁₂E₈, was also preserved better when the membranes had been incubated with the lower concentration of pullulan (or with 2 mg/mL A8-35) than when it had been incubated either with the larger concentration of pullulan or in the absence of polymer (data not shown). Thus, moderate amounts of modified pullulan are sufficient to keep the SR membranes stable.

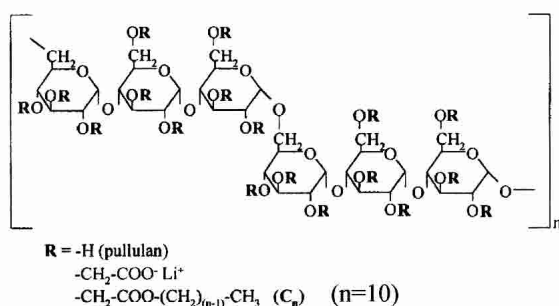
This property can easily be understood by realizing that the polymers, by adsorbing onto the membranes, form hydrophilic coronas (see cartoon at bottom of Fig. 1) (Ueda et al. 1998) which probably minimize vesicle flocculation,

very much in the same manner as Arabic gum stabilizes Indian ink by coating the carbon droplets suspended in water and preventing them from aggregating and falling down to the bottom of the vessel (de Gennes and Badoz 1994; Currie et al. 2003). This is a very general mechanism, probably applicable to many types of membranes and polymers. Modified pullulans were originally not designed for this purpose, but their antiflocculation properties might prove to be an unexpected benefit of the use of these polymers, for those in the membrane biology field who are interested in keeping membranes in nonaggregated form over long periods. Outside this field, it is, in fact, also of interest that liposomes coated with polysaccharide-derived polymers were found particularly stable carriers for drug targeting (e.g., Sunamoto et al. 1992; for review, see Sihorkar and Vyas 2001). In addition to other factors like recognition by target cells or liposome shielding from opsonization or enzymatic degradation by serum proteins, polysaccharide polymers might endow the coated liposomes with a diminished tendency for flocculation.

Materials and methods

The carboxymethylpullulan 18C₁₀ (Scheme 1) was synthesized as described previously (Duval-Terrié et al. 2003). This polymer, with an average molecular mass of 30 kDa, is highly charged (on average, 0.91 ungrafted carboxymethyl group and 0.18 hydrophobic chain per anhydroglucose unit; C10 refers to the decyl linear alkyl group used for grafting). Polymer stock solutions were 50 mg/mL in water. SR vesicles were prepared as previously described (Champeil et al. 1985). The nonionic detergent C₁₂E₈ was obtained from Nikko.

18C₁₀: 0.91 COO⁻ and 0.18 chain per sugar unit
<m>=30 kDa



Scheme 1. The hydrophobically modified pullulan 18C₁₀.

Turbidity (and absorbance) spectra of SR suspensions were measured with a diode array HP 8453 spectrophotometer. Samples in the temperature-regulated cuvette were stirred continuously.

Acknowledgments

We thank J.L. Popot and F. Giusti (UPR CNRS 9052, Paris) for their generous gift of amphipol A8-35; C. Tribet (ESPCI, Paris), C. Vauthier (CNRS UMR 8612, Châtenay-Malabry), M. le Maire, and M. Paternostre (CNRS URA 2096, Saclay) for discussion; and the Human Frontier Science Program Organization for financial support of M.P. (RGP 0060/2001-M).

References

- Champeil, P., Guillaud, F., Vénien, C., and Gingold, M.P. 1985. Interaction of magnesium and inorganic phosphate with calcium-depleted sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase, as reflected by organic solvent induced perturbation. *Biochemistry* **24**: 69–81.
- Champeil, P., Menguy, T., Tribet, C., Popot, J.-L., and le Maire, M. 2000. Interaction of amphipols with sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**: 18623–18637.
- Currie, E.P.K., Norde, W., and Cohen-Stuart, M.A. 2003. Tethered polymer chains: Surface chemistry and their impact on colloidal and surface properties. *Adv. Colloid Interface Sci.* **100–102**: 205–265.
- de Gennes, P.G. and Badoz, J. 1994. *Les objets fragiles*. Plon, Paris.
- Duval-Terrié, C., Cosette, P., Molle, G., Muller, G., and Dé, E. 2003. Amphiphilic biopolymers (amphibiopols) as new surfactants for membrane protein solubilization. *Protein Sci.* **12**: 681–689.
- Ladavière, C., Tribet, C., and Cribier, S. 2002. Lateral organization of lipid membranes induced by amphiphilic polymer inclusions. *Langmuir* **18**: 7320–7327.
- Nagy, J.K., Kuhn Hoffmann, A., Keyes, M.H., Gray, D.N., Oxenoid, K., and Sanders, C.R. 2001. Use of amphipathic polymers to deliver a membrane protein to lipid bilayers. *FEBS Lett.* **501**: 115–120.
- Popot, J.-L., Berry, E.A., Charvolin, D., Creuzenet, C., Ebel, C., Engelman, D.M., Flotenmeyer, M., Giusti, F., Gohon, Y., Hong, Q., et al. 2003. Amphipols: Polymeric surfactants for membrane biology research. *Cell Mol. Life Sci.* **60**: 1559–1574.
- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., and Simons, K. 2003. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 5795–5800.
- Sihorkar, V. and Vyas, S.P. 2001. Potential of polysaccharide anchored liposomes in drug delivery, targeting and immunization. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **4**: 138–158.
- Sunamoto, J., Sato, T., Taguchi, T., and Hamazaki, H. 1992. Naturally occurring polysaccharide derivatives which behave as an artificial cell wall on an artificial cell liposome. *Macromolecules* **25**: 5665–5670.
- Thomas, J.L. and Tirrell, D.A. 1992. Polyelectrolyte-sensitized phospholipid vesicles. *Acc. Chem. Res.* **25**: 336–342.
- Tribet, C. 1998. Hydrophobically driven attachments of synthetic polymers onto surfaces of biological interest: Lipid bilayers and globular proteins. *Biochimie* **80**: 461–473.
- Tribet, C., Audebert, R., and Popot, J.-L. 1996. Amphipols: Polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 15047–15050.
- Ueda, T., Lee, S.J., Nakatani, Y., Ourisson, G., and Sunamoto, J. 1998. Coating of POPC giant liposomes with hydrophobized polysaccharide. *Chem. Lett.* **5**: 417–418.

Manuscrit # 6:

Protective and inhibitory effects of various types of amphipols
on Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study.

Martin Picard, Tassadite Dahmane, Manuel Garrigos, Carole Gauron,
Fabrice Giusti, Marc le Maire, Jean-Luc Popot, and Philippe Champeil

Biochemistry, accepté.

Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study[†]

Martin Picard^{*□}, Tassadite Dahmane^{#□}, Manuel Garrigos^{*}, Carole Gauron^{*},
Fabrice Giusti[#], Marc le Maire^{*}, Jean-Luc Popot[#], and Philippe Champeil^{*§}

[□] These two authors contributed equally to the project.

^{*}Section de Biophysique des Fonctions Membranaires, Département de Biologie Joliot-Curie, Unité de Recherche Associée 2096 (Centre National de la Recherche Scientifique & Commissariat à l'Energie Atomique), CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex (France) and Laboratoire de Recherche Associé 17V & Institut Fédératif de Recherches 46, Université Paris Sud, and [#]Unité Mixte de Recherche 7099 (Centre National de la Recherche Scientifique & Université Paris-7), Institut de Biologie Physico-Chimique, CNRS FRC 550, 11 rue Pierre et Marie Curie, F-75005 Paris (France)

[†] We thank the Human Frontier Science Program Organization for financial support to M.P. and C.G. (RGP 0060/2001-M) and to J.-L. P. (RG00223/2000-M). Work in JLP's laboratory was supported by CNRS and Université Paris-7. T.D. is the recipient of a doctoral fellowship from the MENESR.

[§] For correspondence: Ph Champeil, URA 2096 CNRS & SBFM/DBJC, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette cedex (France).
Tel. 33 1 6908 3731; Fax. 33 1 6908 8139; E-mail: champeil@dsvidf.cea.fr

Running title: Protection and inhibition of SERCA1a by amphipols

FOOTNOTES

¹**Abbreviations:** APol, amphipol; SAPol, a sulfonated amphipol; SR, sarcoplasmic reticulum; ATPase, adenosine triphosphatase; DAGK, diacylglycerol kinase; A8-35, a specific type of polyacrylate-based amphipol (see Diagram 1A); C₁₂E₈, octaethylene glycol monododecyl ether; HPLC, high-pressure liquid chromatography; K_d, distribution coefficient; R_S, Stokes radius; SEC, size exclusion chromatography; EGTA, [ethylenebis (oxyethylenenitrilo)]tetraacetic acid; quin2, 2-[(2-amino-5-methylphenoxy)methyl]-6-methoxy-8-aminoquinoline-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; MOPS, 4-morpholinepropanesulfonic acid; Tris, *tris*(hydroxymethyl)aminomethane; TES, *N-tris*[hydroxymethyl]methyl-2-aminoethane-sulfonic acid; CMC, critical micelle concentration.

ABSTRACT

Amphipols are amphipathic polymers designed to replace or supplement detergents in membrane protein solution studies. Previous work has suggested both advantages and disadvantages to the use of a polyacrylate-based amphipol, A8-35, for studying the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA1a). We investigated this issue further using a set of four amphipols with different chemical structures. Previous size exclusion chromatography experiments had shown that A8-35 and SERCA1a/A8-35 complexes aggregate under certain conditions. We show here that aggregation can be prevented by omitting calcium from buffers or by using a sulfonated version of A8-35. A8-35 had previously been shown to protect Ca^{2+} -ATPase from irreversible denaturation, while inhibiting its activity in a reversible manner. We show here that the other three amphipols tested also display these properties, and that all four amphipols slow down backwards calcium dissociation from the non-phosphorylated solubilized enzyme, *a priori* an unrelated step. As this calcium dissociation involves the opening up of the bundle of transmembrane ATPase segments, the slowing of this process may indicate that multipoint attachment of the polymers to the hydrophobic transmembrane surface damps protein dynamics (“Gulliver” effect). Damping might be the reason why amphipols also simultaneously protect membrane proteins against irreversible denaturation and may inhibit the activity of those of them that display large rearrangements of their transmembrane surface during their catalytic cycle.

Integral membrane proteins are the object of intensive studies, because they fulfill essential physiological functions and constitute important biomedical targets. However, *in vitro* studies of membrane proteins are hampered by aggregation in aqueous solutions, due to the high hydrophobicity of the surface of their transmembrane region. Detergents prevent this aggregation by adsorbing onto transmembrane surfaces, thereby providing an interface with the hydrophilic medium (1). However, detergents are dissociating surfactants, which very often destabilize membrane proteins. One of the major challenges in membrane protein biochemistry is therefore to achieve an acceptable compromise between solubility and biochemical stability (for discussions, see *e.g.* refs. 2-3). This problem has prompted the design of milder surfactants, which may not necessarily extract proteins from biological membranes efficiently, but can substitute for detergents after solubilization and are more efficient at keeping membrane proteins in solution without inactivation (for reviews, see *e.g.* refs. 4-5).

'Amphipols' (APols) are amphipathic polymers specially designed for this purpose (6). First-generation APols have a polyacrylate backbone onto which fatty amines are grafted (Diagram 1A) (6). APols and their uses in membrane biology have been the subject of two recent reviews (5, 7). Polyacrylate-based APols, as well as some non-ionic or zwitterionic APols, keep membrane proteins soluble in the absence of detergent (in most cases, after extraction from the membrane with detergents). Membrane proteins are generally more stable after trapping with APols than in detergent solution. Thus, APols are potentially useful substitutes for detergents for *in vitro* functional or structural studies of detergent-sensitive membrane proteins (see *e.g.* refs. 7-8, and references therein). However, the behavior of these molecules and of membrane protein/APol complexes is far from being completely understood. Furthermore, there is an enormous variety of conceivable APol chemical structures (see *e.g.* refs. 9-10). Optimizing APols for work with specific types of membrane protein, or for particular experimental approaches, requires a more detailed understanding of the solution behavior of APol and protein/APol complexes, and of the stability and activity of APol-trapped proteins.

[DIAGRAM 1]

Early studies of polycarboxylate-based or non-ionic APols established that both classes of polymers allowed membrane proteins to retain their native structure (6, 7, 10, 11). Most data suggest little or no interference of APols with membrane protein function (7, 11, 12; see *Supporting Information* for a more detailed review). However, a different conclusion was reached in an earlier study of complexes between APol A8-35 and the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA1a): while A8-35 was found to strongly stabilize the calcium pump against irreversible inactivation, it also inhibited its ATPase activity, an inhibition that could be reversed by excess detergent (13). Thus, the prevalence and mechanism(s) of membrane protein functional inhibition by APols remain open questions; addressing them was the main purpose of the present work. Previous studies also found that, while the formation of complexes between membrane proteins and A8-35 generally yields monodisperse particles (see *e.g.* refs. 6, 7, 14-17, and *Supporting Information*), A8-35 and Ca^{2+} -ATPase/A8-35 complexes exhibited a strong tendency to aggregate (13). The secondary aim of this study, of practical relevance, was to identify the cause of this aggregation and to find ways of preventing it.

In the course of the present work, we used four different APols: A8-35 and a polysulfonated analog thereof ("SAPol"; Diagram 1B), both synthesized by us, and two commercial APols, the zwitterionic PMAL-C12 (12) and its sulfonated (and thus anionic) analog, PMALA-C12 (Scheme 1D). Their comparative study led to interesting insights into the mechanisms of membrane protein functional inhibition by APols and the causes of aggregation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

The structures of the four types of APol tested are shown in Diagram 1. A8-35, an anionic, polyacrylate-based APol (Scheme 1A), was synthesized either as described in *ref. 6* (batch *GPPHR*, hereafter referred to as "old") or with the modifications described in *refs. 16-17* (batches *FGH15* and *FGH20*, hereafter referred to as "new"). The average molecular mass of A8-35 was between ~9 and ~10 kDa, depending on the size of the polyacrylic acid precursor; such variability has no detectable effect on solution properties (*17*). Some early A8-35 batches, including batch *GPPHR*, were found to contain an excessive amount of grafting by dicyclohexylurea (DCU), a derivative of the activating agent dicyclohexylcarbodiimide, which confers them a tendency to aggregate (see *refs. 16-17*). The synthesis of SAPol, a sulfonated analog of A8-35 (Diagram 1B; batch *FGHS8*), will be described elsewhere (F. Giusti, *in preparation*). The level of DCU grafting, determined by NMR, was ~10% (*GPPHR*), ~2% (*FGH15* and *FGH20*), and ~0% (*FGHS8*) of the acrylate units. PMAL-C12 (Diagram 1C; referred to as PMAL-B-100 in *ref. 12*) and PMALA-C12 (Diagram 1D) were bought from Anatrache (*refs. P5012* (batch *12PM08*) and *PA5012* (batch *12PA01*), respectively). Polymer stock solutions were made at a concentration of 50 mg/ml in Milli-Q deionized water. SR vesicles were prepared as previously described (*18*). C₁₂E₈ (CMC = 50 µg/ml, about 0.09 mM) was bought from Nikko, and dodecylmaltoside (CMC = 90 µg/ml, about 0.18 mM) from Calbiochem.

Size exclusion HPLC chromatography (SEC) of APols alone was performed as previously described (*12*), using a Beckman GOLD system with diode array detection (1-cm optical path-length) and calibration (K_d vs. R_s ; see *ref. 19*) with Bio-Rad standards (Cat. number 151-1901). We loaded 200-µl samples of 5-mg/ml APol onto an Amersham TSK 3,000 SW silica gel column (7.5 mm × 30 cm, total volume ~11.5 ml), run at 23°C. Some experiments were carried out with a ProteinPak TSK 300 silica column loaded with 100-µl samples, with Waters HPLC chromatographic equipment, with similar results. Most experiments were carried out in 100 mM KCl, 20 mM Tes-NaOH, pH 7 ("KCl/Tes pH 7 buffer"), with or without metal ions and/or chelators.

The turbidity and absorbance of APol or SR suspensions were assessed with a diode array HP 8453 spectrophotometer. Samples in the controlled-temperature cuvette were stirred continuously.

ATPase activity was determined at 20°C with a coupled enzyme assay in the HP 8453 spectrophotometer, in a medium comprised of 100 mM KCl, 1 mM Mg²⁺, 50 mM Tes-Tris, 0.1 mM Ca²⁺ and 0.05 mM EGTA (pH 7.5), supplemented with 5 mM MgATP, 0.1 mg/ml pyruvate kinase, 1 mM phosphoenol pyruvate, 0.1 mg/ml lactate dehydrogenase and an initial concentration of about 0.3 mM NADH ("ATPase activity assay medium") (*20*). Where indicated, C₁₂E₈ was added at the desired concentration.

Calcium dissociation from Ca²⁺-ATPase was monitored by a stopped-flow method, with BioLogic SFM3 equipment and the Ca²⁺-sensitive fluorophore quin2 (potassium salt; Calbiochem) as a Ca²⁺ chelator (*21*). The excitation wavelength was 312 nm.

RESULTS

Effect of divalent cations on the aggregation of various amphipols

Earlier SEC studies of pure A8-35 particles and Ca^{2+} -ATPase/A8-35 complexes showed that, in our typical SERCA1a buffer (KCl/Tes pH 7 buffer plus 1 mM Mg^{2+} and 0.5 mM Ca^{2+}), both of them formed aggregates, some of which were eluted in the void volume of the column (13). Subsequent studies with other proteins, such as bacteriorhodopsin (14) or the transmembrane domain of OmpA (15), indicated that the aggregation behavior of the polymer largely determines that of membrane protein/APol complexes. We therefore reinvestigated buffer effects on the behavior of A8-35 particles. Chromatogram A in Fig. 1 confirms that A8-35 alone (in the absence of detergent or protein), prepared as for the experiments in ref. 13 ("old" batch), diluted to 5 mg/ml in SERCA1a buffer and subjected to SEC on a TSK column equilibrated with the same medium, elutes as extremely polydisperse particles. It has recently been shown that the mode of synthesis and purification of A8-35 can have a profound influence on its solution behavior: in particular, excessive artifactual grafting of dicyclohexylurea (DCU) may occur under certain conditions, as was the case for the "old" batch used here (see *Materials & Methods*), which predisposes the resulting polymer to aggregation (16-17). We therefore repeated the SEC experiments using a recent batch of A8-35 ("new" batch) with a low level (~2%) of artifactual grafting. Under the same SEC conditions, this new batch also appeared polydisperse, but with far fewer very large particles (Fig. 1B).

[Figure 1]

Polydispersity was reduced even more markedly if EDTA was added to chelate all divalent cations (dotted line in Fig. 1C): the elution profile revealed a main population of particles with a Stokes radius of ~3 nm (by reference to protein standards). This value is identical to that previously obtained, in the absence of divalent cations, by both SEC and small-angle neutron scattering (3.15 ± 0.15 nm; see refs. 14, 17). A small fraction of particles eluting slightly earlier than the main fraction was still present (Fig. 1C), possibly due to slow aggregation of A8-35 at pH 7 (17). The effect of divalent cations on the aggregation of A8-35 was confirmed using an "old" batch of A8-35 and a different type of column ("ProteinPak") (see *Figure S1 in Supporting Information*). Further experiments were performed to sort out the extent to which Ca^{2+} and Mg^{2+} contribute to the aggregation of A8-35. The presence in the elution buffer of 1 mM Mg^{2+} (but no Ca^{2+}) modified the elution pattern of A8-35 only slightly from that obtained in the total absence of divalent cations (Fig. 1C, solid vs. dotted lines), whereas the addition of this concentration of Mg^{2+} plus 0.5 or 1 mM Ca^{2+} induced aggregation much more strongly (Fig. 1E, F). The presence of ~5 μM free Ca^{2+} (Fig. 1D) only slightly increased the effect of Mg^{2+} alone. In our previous work (13), divalent cations had been added to the HPLC buffers because they are known to slow down the irreversible denaturation of solubilized Ca^{2+} -ATPase (e.g. refs. 22-24). This was most likely the reason for the observed tendency of both A8-35 alone and Ca^{2+} -ATPase/A8-35 complexes to aggregate.

[Figure 2]

The aggregative effect of calcium on A8-35 can constitute a serious hindrance when designing experiments requiring both the presence of calcium and monodispersity of membrane protein/APol particles. We therefore examined whether aggregation could be avoided by using APols with different chemical structures. No aggregation was observed with a sulfonated analog of A8-35, SAPol, which, unlike A8-35, remained monodisperse in the presence of 1 mM Mg^{2+} and 0.5 mM Ca^{2+} (compare Figs. 2A and 2B). In contrast, PMAL-C12 (PMAL-B-100 in ref. 12), a zwitterionic APol that also contains carboxylic groups, experienced even stronger aggregation than A8-35 in the presence of Ca^{2+} (Fig. 2C). PMALA-C12, a sulfonated analog of PMAL-C12, gave fairly large particles both in the presence and absence of divalent cations (Fig. 2D). The addition of very high concentrations (e.g. 30 mM) of Ca^{2+} to A8-35 solutions resulted in the development of visible turbidity, at a rate strongly dependent on the concentrations of APol and Ca^{2+} concentrations. On the other hand, even in these conditions, no aggregation was observed with SAPol (see *Figure S2 in Supporting Information* for further details).

Functional consequences of the complexation of detergent-solubilized Ca^{2+} -ATPase by APols

The complexation of detergent-solubilized SERCA1a by A8-35 has been shown to decrease ATPase activity, while inhibition is reversed by excess detergent (13). This observation was confirmed here with a "new" batch of A8-35 (Fig. 3A). Similar observations were made with PMAL-C12 (Fig. 3B), SAPol (not shown) and PMALA-C12 (not shown). Comparison of the effects of the four APols on ATPase activity showed that higher doses of SAPol are required for similar levels of inhibition (Fig 3C).

[Figure 3]

Following its dilution in a detergent-free solution, the solubilized Ca^{2+} -ATPase is immediately and irreversibly inactivated in the absence of APols (*e.g.* ref. 24; see top right trace in Fig. 4A). We previously showed that adding APol A8-35 to the protein/detergent solution before dilution protects the enzyme against this inactivation (13). This protective effect was confirmed here with the "new" batch of A8-35 (bottom right trace in Fig. 4A), as well as with the other three APols (Fig. 4B&C, *right traces*); as for inhibition, higher concentrations of SAPol than of the other APols were required to achieve the same degree of protection (Fig. 4B, *right traces*).

[Figure 4]

A8-35 has also been shown to protect against irreversible inactivation under different conditions: incubation of detergent-solubilized ATPase in detergent-containing but calcium-free solutions (13). This effect also was reproduced here with all four APols tested (Fig. 5); again, a higher concentration of SAPol (Fig. 5B) than of the other APols (Fig. 5D) was required for maximal protection.

[Figure 5]

It would be conceivable to try to identify the step in the ATPase catalytic cycle that is the main target of the inhibitory effect of APols (as attempted in studies of the modulatory effects of detergents (25), for example). However, this would not necessarily lead to identifying the molecular mechanism responsible for the effect. Instead, we explored possible reasons for the apparent correlation between inhibition and protection by measuring the effects of APols on an *a priori* unrelated step: calcium dissociation from the transmembrane Ca^{2+} -binding sites of non-phosphorylated ATPase towards the cytosolic side of the membrane ($\text{Ca}_2\text{E1} \rightarrow \text{E2}$, top left of Fig. 6). This step is clearly not rate-limiting for overall ATPase activity, as its direction in the enzyme cycle is opposite to that of Ca^{2+} -dependent ATP hydrolysis (top left in Figure 6).

[Figure 6]

The rate of calcium dissociation from unphosphorylated ATPase was measured by mixing in a stopped-flow instrument (see *e.g.* ref. 21) preformed ATPase/ Ca^{2+} complexes with an excess of quin2, a chelator that binds Ca^{2+} (released from the ATPase) with an immediate change in fluorescence (26-28). In control experiments with SR membranes (top trace in Fig. S3 in Supporting Information), Ca^{2+} rapidly dissociated from its binding sites, as expected, with a k_{obs} of about 16 s^{-1} . The rate constant of the quin2 fluorescence signal did not change significantly ($k_{\text{obs}} \approx 14 \text{ s}^{-1}$) after the addition of detergent in sufficient amounts (2.5 g/g) to solubilize SR membranes (29), but the amplitude of the signal was halved (see bottom trace in Fig. S3 in Supporting Information). This suggests that solubilization speeds up the dissociation of the first Ca^{2+} ion (bound at site II), which now occurs within the dead time of the stopped-flow instrument, while having no significant effect on the rate of dissociation of the second Ca^{2+} ion (bound at site I). In these conditions, the addition of A8-35 to C_{12}E_8 -solubilized ATPase did not affect the overall amplitude of the change in quin2 fluorescence, but decreased its rate by a factor of up to four (Fig. 6A). This effect was also observed with the other three APols (Fig. 6B). SAPol again was the least efficient of the four APols at slowing down backward Ca^{2+} dissociation (Fig. 6B), just as it was the least efficient at slowing down forward ATP hydrolysis (Fig 3) or at protecting the ATPase from irreversible inhibition (Figs 4 & 5); yet, ionic conditions and protein/APol/detergent ratios are fairly different in these four experiments.

DISCUSSION

Earlier work on complexes of A8-35 with Ca^{2+} -ATPase (13) identified a couple of difficulties that had not been encountered with other membrane proteins. We tried here to establish the origin of such difficulties and to determine whether they are intrinsic to the use of APols or can be circumvented. We also further explored whether the fact that APols both stabilize and reversibly inhibit the ATPase is coincidental or is underlain by a common molecular mechanism.

Divalent cations induce the aggregation of polyacrylate-based amphipols: a caveat, plus solutions

One problem encountered earlier (13) was the strong tendency of A8-35 to form aggregates in certain conditions. In the present study, size exclusion chromatography and turbidity measurements showed that Ca^{2+} (and, to a much lesser extent, Mg^{2+}) induces A8-35 aggregation. A broadening of the HPLC profile is already detectable in the presence of 0.5 mM Ca^{2+} , and massive time-dependent aggregation occurs at $[\text{Ca}^{2+}]$ higher than a few mM. Thus, in conjunction with the fact that the batches of A8-35 used for our earlier experiments did not yield as monodisperse particles in divalent cation-free buffers as the new batches used in the present work, the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} appears to have been primarily responsible for the polydispersity of Ca^{2+} -ATPase/APol particles observed previously (13). Possible physical chemical mechanisms accounting for this effect are briefly discussed in *Supporting Information* (see also refs. 30-33).

We investigated the sensitivity to calcium ions of three other APols with different chemical structures, as potential alternatives to A8-35. PMAL-C12, a zwitterionic APol at neutral pH, was found to aggregate even more strongly than A8-35 in the presence of calcium. On the contrary, a sulfonated version of A8-35 (SAPol) displayed very low, if any, sensitivity to calcium. Thus, the problem of calcium-induced aggregation can be circumvented by using different APols. Note, however, that most membrane proteins can be handled in the absence of calcium. Our size exclusion chromatography data also indicate that the combination of a millimolar concentration of Mg^{2+} and a micromolar concentration of Ca^{2+} does not result in the formation of large A8-35 aggregates. Thus, A8-35 can probably be used for most experiments with membrane proteins requiring only a cytosol-like medium.

Reversible inhibition of ATPase activity, and protection against denaturation: a case of “Gulliver and the Lilliputians”?

All four APols tested inhibited the catalytic activity of detergent-solubilized Ca^{2+} -ATPase. As ternary complexes are formed in membrane protein solutions containing both APols and detergent (above or below the CMC) (13, 34-35), this inhibitory effect is not particularly surprising in itself. However, more remarkably, the various APols tested proved effective for protecting the ATPase from irreversible inhibition with similar relative efficiencies: PMAL-C12 and PMALA-C12 had effects similar to those of A8-35, whereas higher concentrations of SAPol were required for equivalent levels of inhibition or protection. Recent experiments have led to the suggestion that part of the mechanism by which A8-35 supports the renaturation of membrane proteins is the creation of repulsive interactions between complexes: these would protect the refolding proteins from interacting one with another, thereby preventing the formation of unproductive aggregates (Pocanschi, C. L., Dahmane, T., Gohon, Y., Apell, H.-J., Kleinschmidt, J.H. and Popot, J.-L., in preparation). Such an isolating mechanism could well contribute to protecting the Ca^{2+} -ATPase against irreversible denaturation. However, it does not explain the observed correlation with inhibition. A previous survey of many different detergents found no obvious correlation between their effect on steady-state ATPase activities and their effect on the rate of irreversible denaturation (24). Thus, the observation that SAPol was simultaneously the least inhibitory and the least protective of the four APols tested, if not a simple coincidence, suggests that there may be a common mechanism underlying inhibition and protection by APols.

Independently, we found that all four APols slowed the dissociation from solubilized ATPase of at least one Ca^{2+} ion (such dissociation runs in the opposite direction to normal ATPase turnover), SAPol again being the least efficient of the molecules tested (Figure 6). As control activity measurements revealed no evidence for any increase of the apparent affinity of the solubilized ATPase

for Ca^{2+} in the presence of A8-35 (data not shown), the slowing of the rate of Ca^{2+} dissociation may well reflect a true kinetic effect, *i.e.*, an increase in the activation energy for Ca^{2+} escape from its binding site (destabilization of the “transition state” rather than a shift in the equilibrium between initial and final states). In known SERCA1a structures, the high-affinity binding site for Ca^{2+} (“site I”) is deeply embedded within the bundle formed by the protein transmembrane segments, with no open pathway leading to the cytosol (36). Ca^{2+} dissociation, which is accompanied by considerable conformational rearrangements of the transmembrane region (37-39), must therefore involve some sort of “breathing” of the protein, providing a transient escape route from the inside of the bundle to the aqueous phase. Thus, the results of our Ca^{2+} dissociation experiments may indicate that, in the presence of detergent, this process of “breathing” is slowed down by APols.

At the molecular level, a possible mechanism for this effect could be offered by what we previously dubbed the “Gulliver effect” (7), so named by analogy to Swift's character tied to the ground by the tiny strings of the Lilliputians (40). Although most individual points of contact between APol alkyl chains and the hydrophobic surface of the protein are likely to be transient on the millisecond time scale of enzymatic reactions (for a discussion, see *ref.* 7), the large number and close spatial proximity (within nanometers) of these contacts may damp collective movements. Specifically, multipoint attachment of APol molecules to the ATPase may reduce the frequency and/or amplitude of movements tending to open up the ATPase transmembrane bundle: APols thereby may slow down Ca^{2+} dissociation from site I. This would not necessarily interfere in a detectable manner with Ca^{2+} dissociation from site II, as the latter mainly depends on reorientation of the side chain of the more peripheral residue E309 (a reorientation which may be specifically accelerated by the detergent-dependent increase in *local* microviscosity): Gulliver can still move his head or feet, but large-scale movements are hampered (more on this in *Supporting Information*).

We cannot exclude other mechanisms for the slowing of Ca^{2+} dissociation by APols. For example, APols might also interfere with the large conformational changes in the *cytosolic* domains of the ATPase which are crucial for long-range coupling to movements of the transmembrane segments. However, the Gulliver mechanism, suggesting that APol-dependent restriction of the movements of the ATPase transmembrane section accounts for the reduced rate of Ca^{2+} dissociation, has the advantage of simultaneously providing a tentative explanation for ATPase protection, by the same APols, against irreversible denaturation. Indeed, it has been suggested that the irreversible denaturation of detergent-solubilized monomeric ATPase exposed to high temperatures is dominated by the behavior of the transmembrane segments, with the Ca^{2+} -binding domain being unfolded first (41). The fact that ATPase inactivation in the presence of detergent is faster in the absence of Ca^{2+} than in its presence may also be attributed in part to “cross-linking” of the transmembrane segments by the Ca^{2+} ions (bound to the negatively charged ligand residues on M4, M5, M6 and M8, see *ref.* 36): denaturation of the ATPase presumably starts with a limited, transient, reversible unfolding of its transmembrane region, which would become irreversible upon further unfolding and/or formation of intermolecular contacts. By damping the dynamics of large-amplitude transmembrane movements, APols may thus also slow down denaturation.

As breathing of the transmembrane segments is also required for the forward cycle of ATP hydrolysis, the Gulliver mechanism may also provide a tentative molecular mechanism for the fact that ATPase activity is reversibly inhibited by APols. But, interestingly, it also provides a simple tentative explanation for the fact that slowing down by APols can be observed for one membrane protein (*e.g.* the Ca^{2+} -ATPase), but not for others (*e.g.* the nicotinic acetylcholine receptor (11) or bacteriorhodopsin (*Pocanschi et al.*, *in preparation*), since it ties inhibition to the amplitude of the rearrangements of the transmembrane surface that occur during the functional cycle. A related hypothesis has been put forward concerning the mechanism of inhibition of ion channels by general anesthetics: the most sensitive channels would be those whose function entails the largest transient changes in transmembrane cross-sectional area (42). Indeed, another member of the P-type ion-transporting pump family to which Ca^{2+} -ATPase belongs, Na^+, K^+ -ATPase, has been shown to presents unusually large activation volumes for the forward and backward transitions corresponding to occlusion and deocclusion of potassium ions (43). The activity of the Ca^{2+} -ATPase itself is known to depend on hydrostatic pressure (*e.g.* *ref.* 44), again suggesting fairly large activation volumes during ATP hydrolysis. In keeping with these observations, X-ray studies have revealed that transitions between functional states during the enzymatic cycle involve extensive changes of the Ca^{2+} -

ATPase/membrane interface (37-39; 45-48). Such does not seem to be the case for membrane proteins whose transconformations are not inhibited by A8-35, such as the nicotinic acetylcholine receptor or bacteriorhodopsin (49-52). The inhibition of Ca^{2+} -ATPase by APols may thus be related to the large amplitude of its transmembrane conformational transitions.

Conclusion

This work represents a first step towards determining which of the physical and biochemical properties of membrane protein/APol complexes are general and which depend on the specific chemical structure of the APol or on the membrane protein studied. Our observations confirm that tailoring the chemical structure of APols can be used to overcome some of the problems encountered with first-generation APols, such as calcium binding by A8-35. They also suggest that APols may help to stabilize membrane proteins by slowing down movements of the polypeptide chain that involve substantial rearrangements of the transmembrane surface, such as transmembrane helix bundle “breathing” in an ion-transporting pump. The APol layer surrounding the transmembrane region of the protein may therefore act not only as a “diving suit” (5), but also as a “strait jacket”. Thus, for membrane proteins such as the Ca^{2+} -ATPase, the catalytic activity of which requires large-amplitude transmembrane rearrangements (42), functional (and reversible) inhibition by APols might be the price to be paid for biochemical stabilization. This hypothesis, although speculative, provides a framework for the planning or interpretation of functional or structural investigations of other membrane proteins with APols. The dynamics of APol-trapped membrane proteins and relationships to functional effects form a fascinating subject for further studies, which may prove informative for both polymer adsorption studies and membrane protein biophysics.

Acknowledgments: We thank C. Tribet (Paris, CNRS UMR 7615), Y. Gohon (UMR 7099), S. Orlowski & S. Martin (URA 2096 CNRS/CEA) and J. V. Møller (University of Aarhus) for stimulating discussions.

Supporting Information available:

Previously documented effects of APols on membrane protein function

Previously documented properties of A8-35 in solution

Figure S1. The presence or absence of millimolar divalent cations has a critical effect on the aggregation state of amphipol A8-35 in the absence of detergent.

Figure S2. Effect of calcium on the turbidity of A8-35 and SAPol solutions.

Possible physical chemical mechanisms for the aggregating effect of divalent cations

Figure S3. Ca^{2+} dissociation from detergent-solubilized Ca^{2+} -ATPase, as measured with a quin2 stopped-flow assay.

Possible implications for the “flickering gate” mechanism

This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES

1. le Maire, M., Champeil, P., and Møller, J. V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents, *Biochim Biophys Acta* 1508, 86-111.
2. Garavito, R. M., and Ferguson-Miller, S. (2001) Detergents as tools in membrane biochemistry, *J. Biol. Chem.* 276, 32403-32406.
3. Bowie, J. U. (2001) Stabilizing membrane proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 397-402.
4. Gohon, Y., and Popot, J.-L. (2003) Membrane protein-surfactants complexes, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8, 15-22.
5. Sanders, C. R., Hoffmann, A. K., Gray, D. N., Keyes, M. H., and Ellis, C. D. (2004) French swimwear for membrane proteins, *ChemBioChem* 5, 423-426.
6. Tribet, C., Audebert, R., and Popot, J.-L. (1996) Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 15047-15050.
7. Popot, J.-L., Berry, E. A., Charvolin, D., Creuzenet, C., Ebel, C., Engelman, D. M., Flötenmeyer, M., Giusti, F., Gohon, Y., Hong, Q., Lakey, J. H., Leonard, K., Shuman, H. A., Timmins, P., Warschawski, D. E., Zito, F., Zoonens, M., Pucci, B., and Tribet, C. (2003) Amphipols: polymeric surfactants for membrane biology research, *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1559-1574.
8. Zoonens, M., Catoire, L.J., Giusti, F. & Popot, J.-L. (2005) NMR study of a membrane protein in detergent-free aqueous solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8893-8898.
9. Nagy, J. K., Kuhn Hoffmann, A., Keyes, M. H., Gray, D. N., Oxenoid, K., and Sanders, C. R. (2001) Use of amphipathic polymers to deliver a membrane protein to lipid bilayers, *FEBS Lett.* 501, 115-120.
10. Prata, C., Giusti, F., Gohon, Y., Pucci, B., Popot, J.-L., and Tribet, C. (2001) Nonionic amphiphilic polymers derived from Tris(hydroxymethyl)-acrylamidomethane keep membrane proteins soluble and native in the absence of detergent, *Biopolymers* 56, 77-84.
11. Martinez, K. L., Gohon, Y., Corringer, P.-J., Tribet, C., Mérola, F., Changeux, J.-P., and Popot, J.-L. (2002) Allosteric transitions of *Torpedo* acetylcholine receptor in lipids, detergent and amphipols: molecular interactions vs. physical constraints, *FEBS Lett.* 528, 251-256.
12. Gorzelle, B.M., Hoffman, A.K., Keyes, M. H., Gray, D. N., Ray, D. G., and Sanders, C.R. (2002) Amphipols can support the activity of a membrane enzyme, *J. Am. Chem. Soc.* 124, 11594-11595.
13. Champeil, P., Menguy, T., Tribet, C., Popot, J.-L., and le Maire, M. (2000) Interaction of amphipols with sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, *J. Biol. Chem.* 275, 18623-18637.
14. Gohon, Y. (2002). Thèse de Doctorat d'Université «Etude structurale et fonctionnelle de deux protéines membranaires, la bactériorhodopsine et le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, maintenues en solution aqueuse non détergente par des polymères amphiphiles», Université Paris-6.
15. Zoonens, M. (2004). Thèse de Doctorat d'Université «Caractérisation des complexes formés entre le domaine transmembranaire de la protéine OmpA et des polymères amphiphiles, les amphipols. Application à l'étude structurale des protéines membranaires par RMN haute résolution», Université Paris-6.
16. Gohon, Y., Pavlov, G., Timmins, P., Tribet, C., Popot, J.-L., and Ebel, C. (2004) Partial specific volume and solvent interactions of amphipol A8-35, *Anal. Biochem.* 334, 318-334.
17. Gohon, Y., Giusti, F., Prata, C., Charvolin, D., Timmins, P., Ebel, C., Tribet, C., and Popot, J.-L. (2005) Well-defined nanoparticles formed by hydrophobic assembly of a short and polydisperse random terpolymer, amphipol A8-35, *submitted*.
18. Champeil, P., Guillain, F., Vénien, C., and Gingold, M. P. (1985) Interaction of magnesium and inorganic phosphate with calcium-deprived sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase as reflected by organic solvent-induced perturbation, *Biochemistry* 24, 69-81.
19. le Maire, M., Ghazi, A., Møller, J. V., and Aggerbeck, L. P. (1987) The use of gel chromatography for the determination of sizes and relative molecular masses of proteins. Interpretation of calibration curves in terms of gel-pore-size distribution, *Biochem. J.* 243, 399-404.

20. Møller, J. V., Lind, K. E., and Andersen, J. P. (1980) Enzyme kinetics and substrate stabilization of detergent-solubilized and membraneous ($\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$)-activated ATPase from sarcoplasmic reticulum. Effect of protein-protein interactions, *J. Biol. Chem.* 255, 1912-1920.
21. Champeil, P., Henao, F. and de Foresta, B. (1997) Dissociation of Ca^{2+} from sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and changes in fluorescence of optically selected Trp residues. Effects of KCl and NaCl and implications for substeps in Ca^{2+} dissociation, *Biochemistry* 36, 12383-12393.
22. Andersen, J. P., Møller, J. V., and Jørgensen, P. L. (1982) The functional unit of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Active site titration and fluorescence measurements, *J. Biol. Chem.* 257, 8300-8307.
23. McIntosh, D. B., and Ross, D. C. (1985) Role of phospholipid and protein-protein associations in activation and stabilization of soluble Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum, *Biochemistry* 24, 1244-1251.
24. Lund, S., Orlowski, S., de Foresta, B., Champeil, P., le Maire, M., and Møller, J. V. (1989) Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 264, 4907-4915.
25. Champeil, P., le Maire, M., Andersen, J. P., Guillain, F., Gingold, M., Lund, S., and Møller, J. V. (1986) Kinetic characterization of the normal and detergent-perturbed reaction cycles of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. Rate-limiting step(s) under different conditions, *J. Biol. Chem.* 261, 16372-16384.
26. Bayley, P., Ahlström, P., Martin, S. R., and Forsen, S. (1984) The kinetics of calcium binding to calmodulin: Quin 2 and ANS stopped-flow fluorescence studies, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 185-181.
27. Champeil, P., Combettes, L., Berthon, B., Doucet, E., Orlowski, S., and Claret, M. (1989) Fast kinetics of calcium release induced by myo-inositol trisphosphate in permeabilized rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 264, 17665-17673.
28. Wakabayashi, S., and Shigekawa, M. (1990) Mechanism for activation of the 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole-labeled sarcoplasmic reticulum ATPase by Ca^{2+} and its modulation by nucleotides, *Biochemistry* 29, 7309-7318.
29. de Foresta, B., le Maire, M., Orlowski, S., Champeil, P., Lund, S., Møller, J. V., Michelangeli, F., and Lee, A. G. (1989) Membrane solubilization by detergent: use of brominated phospholipids to evaluate the detergent-induced changes in Ca^{2+} -ATPase/lipid interaction, *Biochemistry* 28, 2558-2567.
30. Magny, B., Iliopoulos, I., and Audebert, R. (1994) Aggregation of hydrophobically modified polyelectrolytes in dilute solution: ionic strength effects, in: *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology* (Dubin, Bock, Davis, Schultz and Thies Eds) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 51-62.
31. Wang, T. K., Iliopoulos, I., and Audebert, R. (1991) Aqueous solution behavior of hydrophobically modified poly(acrylic acid), in: *Water-Soluble Polymers: synthesis, solution properties, and applications*, Shalaby, S. W., McCormick, C. L., & Butler, G. B., eds., pp 218-231, ACS Symposium series, Washington D.C.
32. Magny, B., Iliopoulos, I., Zana, R., and Audebert, R. (1994) Mixed micelles formed by cationic surfactants and anionic hydrophobically modified polyelectrolytes, *Langmuir* 10, 3180-3187.
33. Petit, F., Audebert, R., and Iliopoulos, I. (1995) Interactions of hydrophobically modified poly(sodium acrylate) with globular proteins, *Colloid Polym. Sci.* 273, 777-781.
34. Tribet, C., Audebert, R. and Popot, J.-L. (1997) Stabilization of hydrophobic colloidal dispersions in water with amphiphilic polymers: application to integral membrane proteins, *Langmuir* 13, 5570-5576.
35. Nowaczyk, M., R. Oworah-Nkruma, M. Zoonens, M. Rögner, and J.-L. Popot (2004) Amphipols: strategies for an improved PS2 environment in aqueous solution, in *Biohydrogen III*. (J. Miyake, Ed.), Kyoto, pp. 151-159, Elsevier, Dordrecht, The Netherlands.
36. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. and Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution, *Nature* 405, 633-634.
37. Toyoshima, C., and Nomura, H. (2002) Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium, *Nature* 418, 605-611.

38. Toyoshima, C., and Inesi, G. (2004) Structural basis of ion pumping by Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum, *Annu. Rev. Biochem.* 73, 269-292.
39. Obara, K., Miyashita, N., Xu, C., Toyoshima, I., Sugita, Y., Inesi, G., and Toyoshima, C. (2005) Structural role of countertransport revealed in Ca^{2+} pump crystal structure in the absence of Ca^{2+} , *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 14489-14496.
40. Swift, J. (1726). *A Voyage to Lilliput*, Chapter One.
41. Merino, J. M., Møller, J. V., and Gutiérrez-Merino, C. (1994) Thermal unfolding of monomeric Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle, *FEBS Lett.* 343, 155-159.
42. Cantor, R. S. (1997) The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia, *Biochemistry* 36, 2339-2344.
43. Bugnon, P., Doludda, M., Grell, E., and Merlbach, A.E. (1997) High-pressure stopped-flow spectrometer for kinetic studies of fast bioorganic reactions by absorbance and fluorescence detection, in *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology* (K. Heremans, Ed.), Leuven University Press, Belgium, pp. 143-146.
44. Hasselbach W., (1988) Pressure effects on the interactions of the sarcoplasmic reticulum calcium transport enzyme with calcium and dinitrophenyl phosphate, *Z. Naturforsch [C]* 43, 929-937
45. Toyoshima, C., and Mizutani, T. (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue, *Nature* 430, 529-535.
46. Toyoshima, C., Nomura, H., and Tsuda, T. (2004) Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues, *Nature*, 442, 361-368.
47. Sørensen, T. L.-M., Møller, J. V., and Nissen, P. (2004) Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump, *Science* 304, 1672-1675.
48. Olesen, C., Sørensen, T. L.-M., Nielsen, R. C., Møller, J. V., and Nissen, P. (2005) Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion, *Science* 306, 2251-2255.
49. Unwin, N. (1995) Acetylcholine receptor channel imaged in the open state, *Nature* 373, 37-43.
50. Unwin, N. (2003) Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy, *FEBS Lett.* 555, 91-95.
51. Miyazawa A., Fujiyoshi, Y., and Unwin, N. (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore, *Nature* 423, 949-955.
52. Neutze, R., Pebay-Peyroula, E., Edman, K., Royant, A., Navarro, J., and Landau, E.M. (2002) Bacteriorhodopsin: a high-resolution structural view of vectorial proton transport, *Biochim. Biophys. Acta* 1565, 144-167.

Pocanschi, C. L., Dahmane, T., Gohon, Y., Apell, H.-J., Kleinschmidt, J.H. and Popot, J.-L. (*in preparation*) Amphipathic polymers: tools to fold integral membrane proteins to their active form.

DIAGRAM LEGEND

DIAGRAM 1. **Chemical structure of the four amphipols used.** A. A8-35, a polyacrylate-based APol, anionic at neutral and basic pH; $\langle x \rangle \approx 35\%$, $\langle y \rangle \approx 25\%$, $\langle z \rangle \approx 40\%$, $\langle n \rangle \approx 76$, mean molecular mass 8-10 kDa (6,17); B. SAPol, a sulfonated APol, anionic at any pH, $\langle x \rangle \approx 35\%$, $\langle y \rangle \approx 25\%$, $\langle z \rangle \approx 40\%$, $\langle n \rangle \approx 76$, mean molecular mass ~ 11 kDa (F. Giusti, unpublished data); C. PMAL-C12, an APol designed to be zwitterionic at neutral and basic pH (12; Anatrache #P5012, PMAL-B-100 in *ref* 12), $\langle n \rangle \approx 30$, mean molecular mass ~ 12 kDa; D. PMALA-C12, a sulfonated version of PMAL-C12 (Anatrache #PA5012), $\langle n \rangle \approx 30$, mean molecular mass ~ 16 kDa.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. **Size exclusion chromatography analysis of two different batches of amphipol A8-35, and effect of divalent cations on A8-35 aggregation.** For Figures 1 and 2, 200- μ l samples of A8-35 at 5 mg/ml were loaded onto a TSK 3,000 SW column equilibrated at room temperature (23 °C). For chromatograms A & B, the medium consisted of KCl/Tes pH 7 buffer supplemented with 1 mM Mg^{2+} and 0.5 mM Ca^{2+} ; A, A8-35 from batch *GPPHR* ("old"); B, A8-35 from batch *FGH15* ("new"). For chromatograms C to F, A8-35 from batch *FGH15* ("new") was used, and the medium consisted of KCl/Tes pH 7 buffer supplemented with either 0.5 mM EDTA (C, dotted line) or 1 mM Mg^{2+} plus 0.5 mM EGTA (C, solid line), 0.5 mM EGTA and 0.45 mM Ca^{2+} (free $\text{Ca}^{2+} \approx 5 \mu\text{M}$) (D), 0.5 mM Ca^{2+} (E; reproduced from B above) or 1 mM Ca^{2+} (F). G: R_s standards, separated in the presence of 1 mM Ca^{2+} : thyroglobulin (670 kDa, $R_s = 8.6$ nm), γ -globulin (158 kDa, $R_s = 5.2$ nm), ovalbumin (44 kDa, $R_s = 2.8$ nm), myoglobin (17 kDa, $R_s = 1.9$ nm) and vitamin B₁₂ (1.3 kDa, $R_s = 0.85$ nm). Absorbance was measured at 257 nm for A8-35 and at 280 nm for standards. For clarity, the various traces have been shifted vertically with respect to each other.

FIG. 2. **Effect of divalent cations on the aggregation of four different amphipols.** Various APols (A, A8-35 (batch *FGH15*); B, SAPol; C, PMAL-C12; D, PMALA-C12) and R_s standards (E) were subjected to SEC in KCl/Tes pH 7 buffer supplemented with 0.5 mM EDTA (dotted lines), 1 mM Mg^{2+} (dashed lines), or 1 mM Mg^{2+} plus 0.5 mM Ca^{2+} (solid lines).

FIG. 3. **Reversible inhibition by amphipols of the ATPase activity of detergent-solubilized SR membranes.** SR vesicles were diluted to 0.004 mg/ml in a detergent-free assay medium, and ATPase activity was monitored continuously with a coupled enzyme system. Samples were successively supplemented with: 1) 0.1 mg/ml (i.e. twice the CMC) C_{12}E_8 , which solubilizes the SR membranes, thereby relieving inhibition due to the accumulation of Ca^{2+} within SR vesicles; 2) APols (either A8-35 (batch *FGH15*), Panel A, or PMAL-C12, Panel B), at final concentrations first of 0.1 mg/ml and then of 0.3 mg/ml; and 3) a larger concentration of C_{12}E_8 , partly relieving inhibition by APols (1 mg/ml was added to the 0.1 mg/ml already present). Panel C, ATPase activities as a function of APol concentration for the four APols tested.

FIG. 4. Protection conferred by various amphipols against irreversible inactivation of detergent-solubilized ATPase upon dilution in a detergent-free medium. Solubilized SR membranes (0.4 mg/ml SR protein and 2 mg/ml dodecylmaltoside) were incubated in the presence or absence of various APols in a medium containing 50 mM KCl, 25 mM Tes-Tris, 0.5 mM Mg^{2+} and 0.05 mM total Ca^{2+} at pH 7.5 and 23°C. After 15-60 minutes, 10- μ l aliquots were diluted (*single arrows*) in 2 ml of ATPase activity assay medium, either after (*left*) or before (*right*) addition of 1 mg/ml $C_{12}E_8$ (*double arrows*) to the assay medium. NADH oxidation was followed as a reporter of ATPase activity. *Panel A*, *top* traces, no polymer; *bottom* traces, preincubation with A8-35 (batch FGH15) at 2 mg/ml. *Panel B*, preincubation with either 2 (*top*) or 20 mg/ml (*bottom*) SAPol. *Panel C*, preincubation with 2 mg/ml of either PMAL-C12 (*top*) or PMALA-C12 (*bottom*).

FIG. 5. Protection conferred by various amphipols against irreversible inactivation of detergent-solubilized ATPase upon calcium depletion. *Panels A-C*: detergent-solubilized SR membranes (0.4 mg/ml SR protein, 1 mg/ml $C_{12}E_8$) were incubated in the presence or absence of various APols in a medium containing 100 mM KCl, 50 mM MOPS-Tris, 0.02 mM total Ca^{2+} and 1 mM EGTA (hence with a very low free Ca^{2+} concentration), at pH 7.0 and 23°C. After various periods, 20- μ l aliquots were diluted in 2 ml of ATPase activity assay medium, supplemented with 1 mg/ml $C_{12}E_8$ and ATPase activity was measured. *Panel A*, no polymer (\square), or A8-35 at 1 mg/ml in the incubation medium (\circ); *Panel B*, SAPol at 1 (\square), 2 (Δ) or 5 mg/ml (∇); *Panel C*, 1 mg/ml PMAL-C12 (Δ) or PMALA-C12 (\diamond). In *Panels B* and *C*, the dotted line represents the control curve in the absence of polymer, reproduced from *Panel A*. In all cases, control incubation in EGTA-free medium (*i.e.* in the presence of 20 μ M Ca^{2+} alone) showed no significant inactivation over 30 minutes (not shown). *Panel D*, rate constants for irreversible inactivation as a function of APol concentration (\circ , A8-35; \square , SAPol; Δ , PMAL-C12; \diamond , PMALA-C12).

FIG. 6. Amphipols slow down Ca^{2+} dissociation from detergent-solubilized Ca^{2+} -ATPase. *Top*, catalytic cycle of Ca^{2+} -ATPase and experimental protocol. *Panel A*, stopped-flow traces. For the control experiment (*top trace*), $C_{12}E_8$ -solubilized SR membranes (0.4 mg protein/ml plus 1 mg/ml $C_{12}E_8$ in the ATPase syringe), equilibrated with 20 μ M Ca^{2+} , were mixed volume for volume with quin2 (at a concentration of 400 μ M in the quin2 syringe), and quin2 fluorescence was monitored with an excitation wavelength of 312 nm and a green filter (MTO DA531) in the emission pathway. For both syringes, the medium otherwise contained 100 mM KCl, 50 mM MOPS-Tris and 50 μ g/ml of $C_{12}E_8$ (*i.e.* close to the CMC) at pH 7 and 20 °C. For experiments in the presence of APols (*middle and bottom traces*), SR in the ATPase syringe was first solubilized with 1 mg/ml $C_{12}E_8$, before APol (here, A8-35) was added at concentrations of either 1 or 2 mg/ml; the quin2 syringe contained 0.05 mg/ml $C_{12}E_8$. Quin2 fluorescence, reflecting the kinetics of dissociation of Ca^{2+} from the ATPase, is expressed as a percentage of its value at the end of the mixing time. For clarity, the two bottom traces have been shifted vertically by about -2 and -4%, respectively. *Panel B*, summary of the rate constants found in parallel experiments with the four APols.

Scheme 1. Chemical structure of the various amphipols
used in this study.

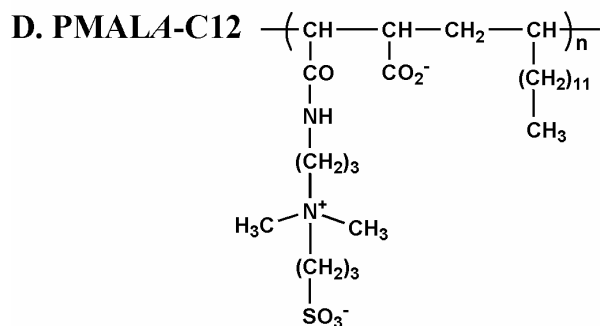
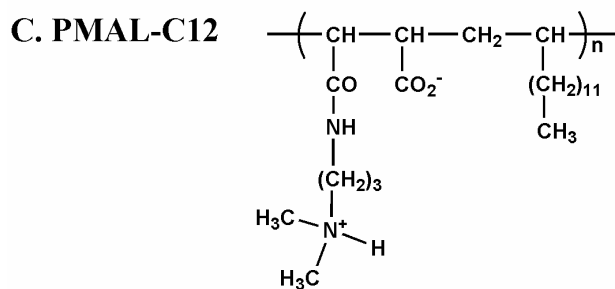
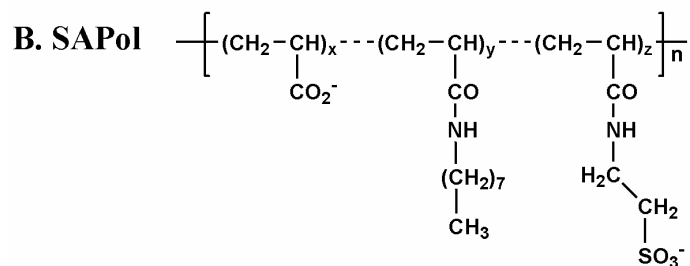
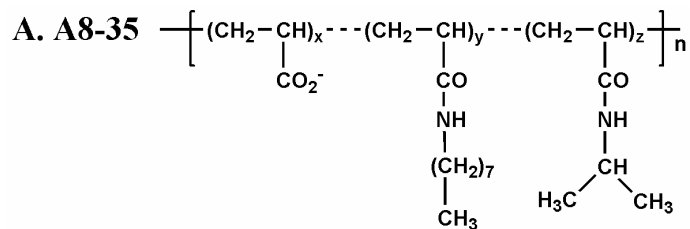


Figure 1. HPLC comparison of different batches of Amphipol A8-35, and effect of divalent cations on A8-35 aggregation.

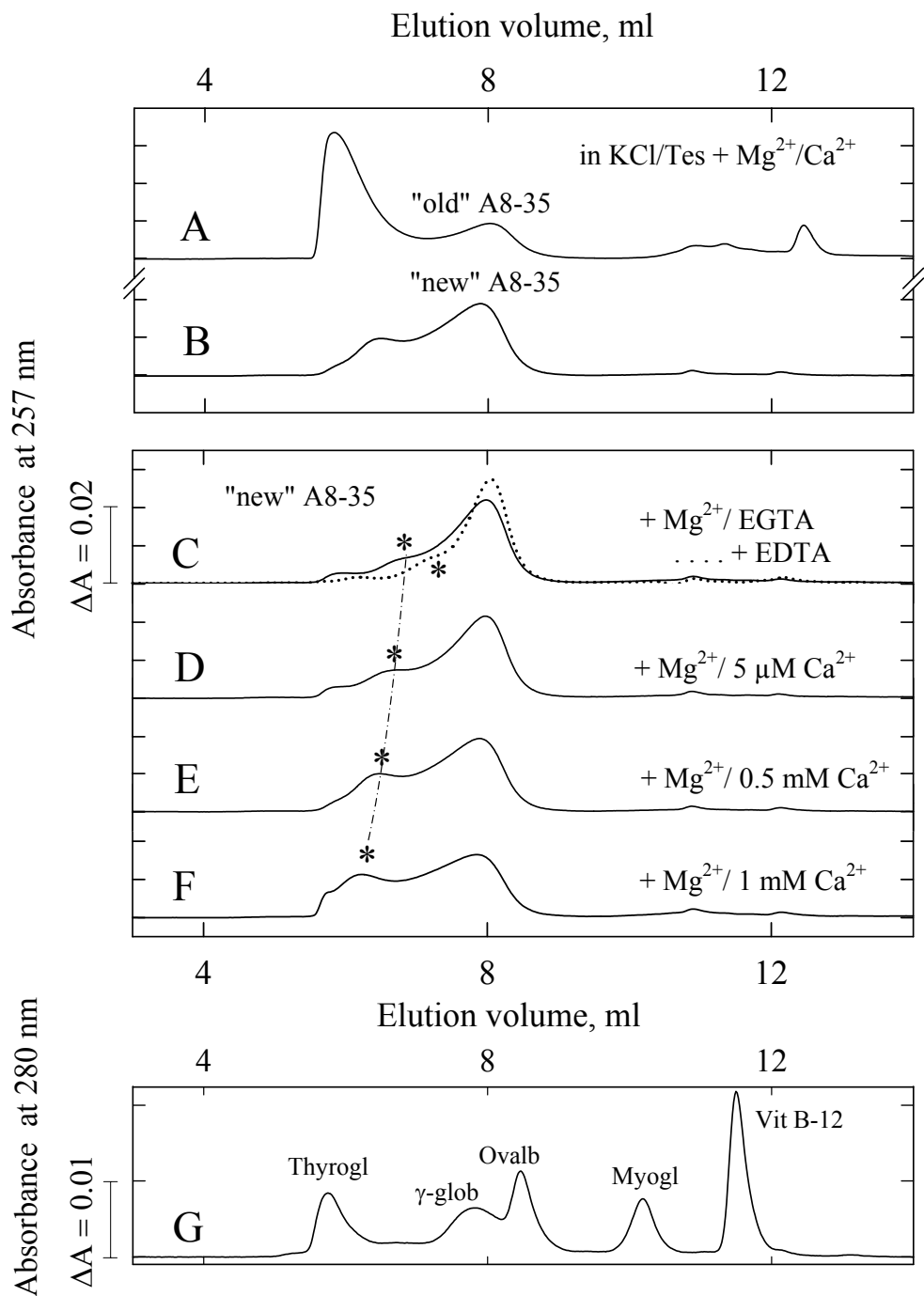


Figure 2. Effect of divalent cations on aggregation of various amphipols: negligible with sulfonated amphipols.

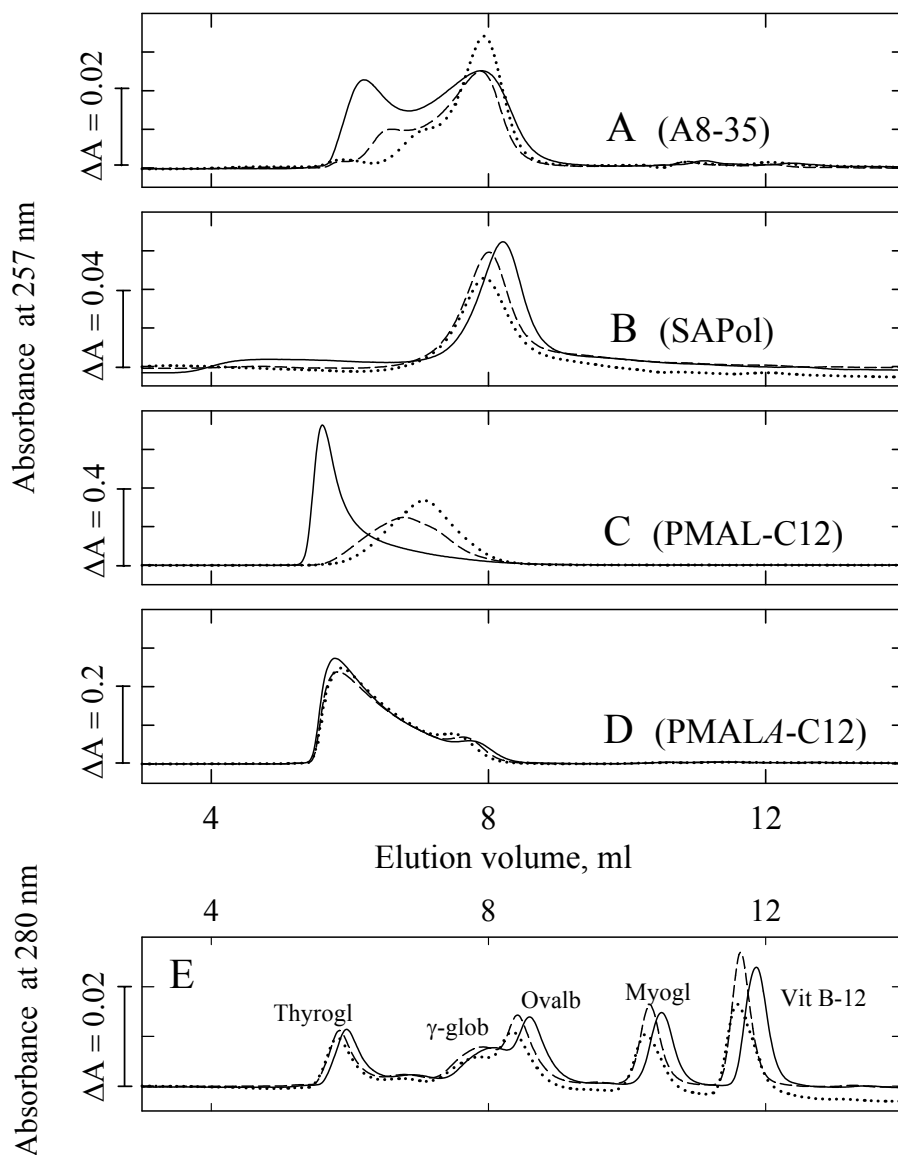


Figure 3. Perturbation by A8-35 and other amphipols of ATPase activity in the presence of $C_{12}E_8$.

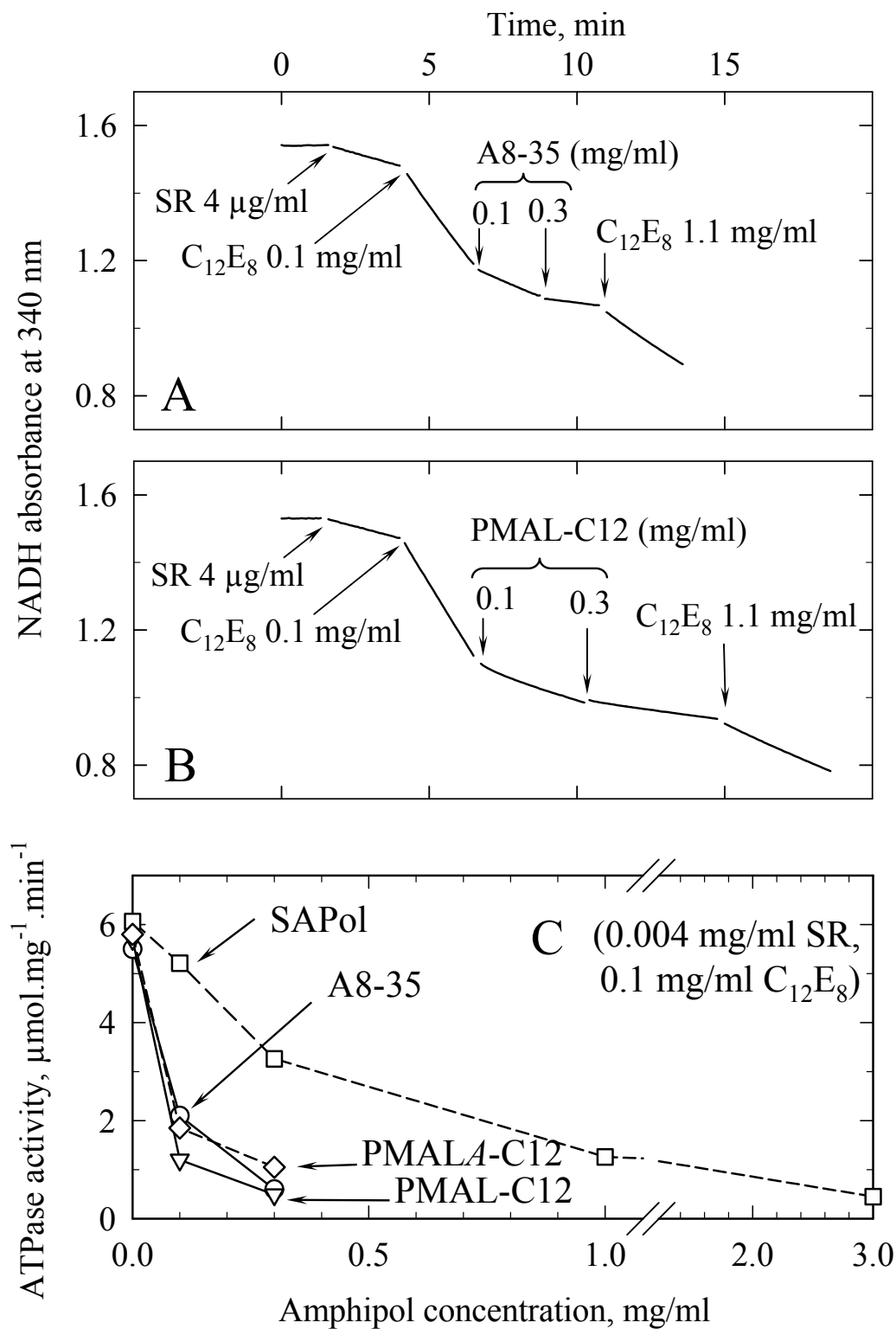


Figure 4. Protection conferred by various amphipols against irreversible inactivation of detergent-solubilized ATPase upon its dilution in a detergent-free medium.

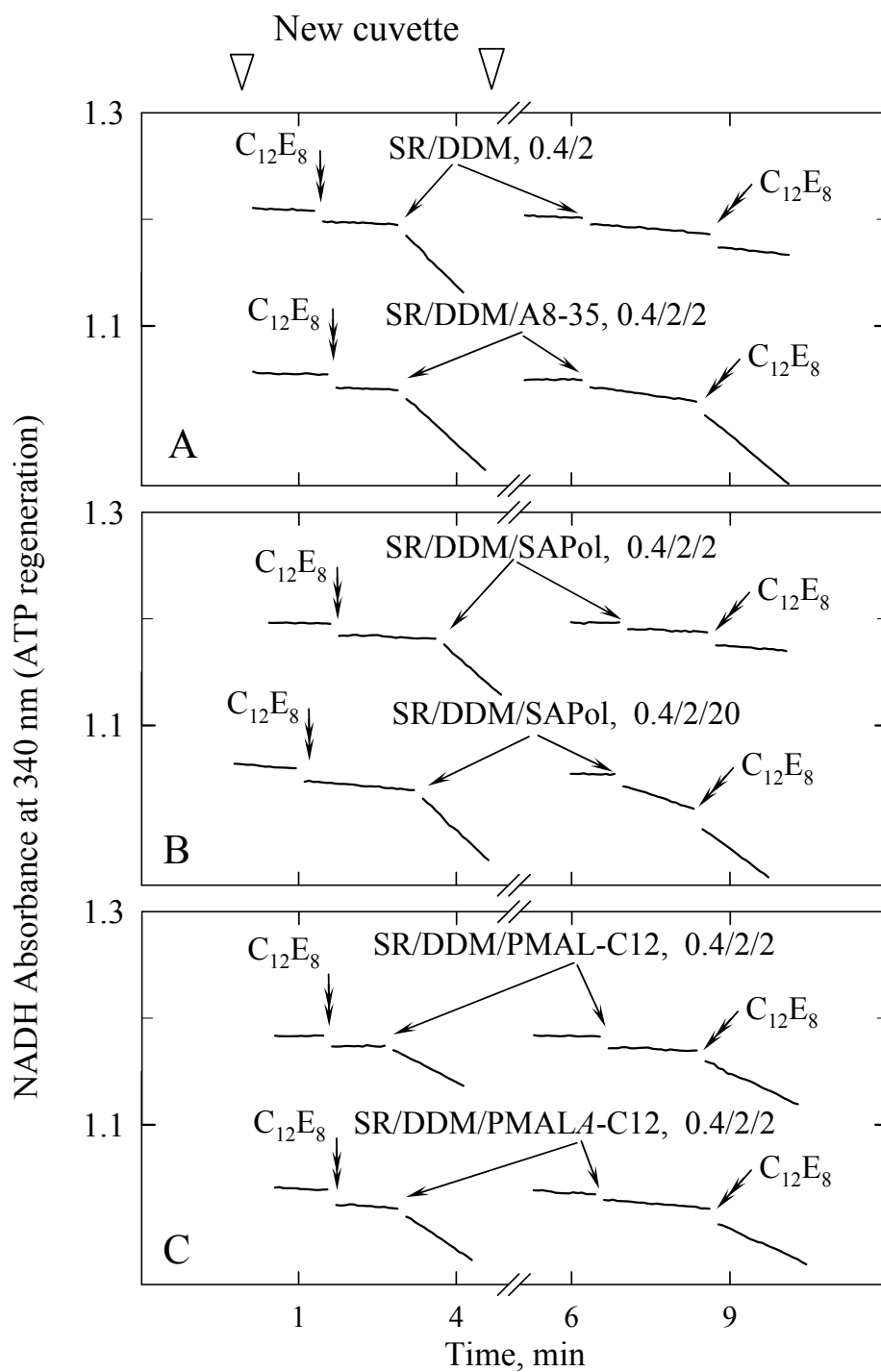


Figure 5. Protection conferred by various amphipols against irreversible inactivation of detergent-solubilized ATPase in the absence of Ca^{2+} .

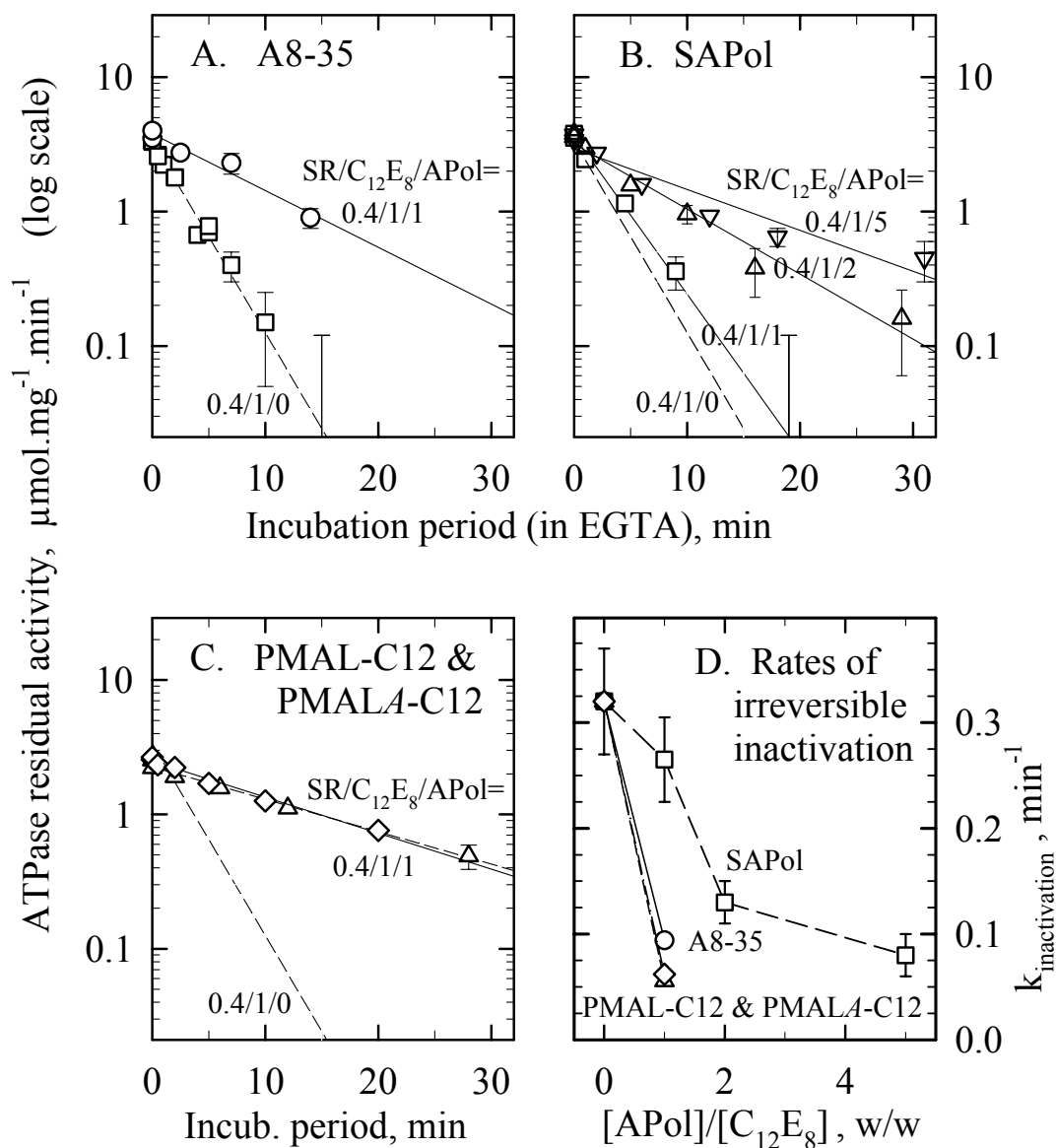
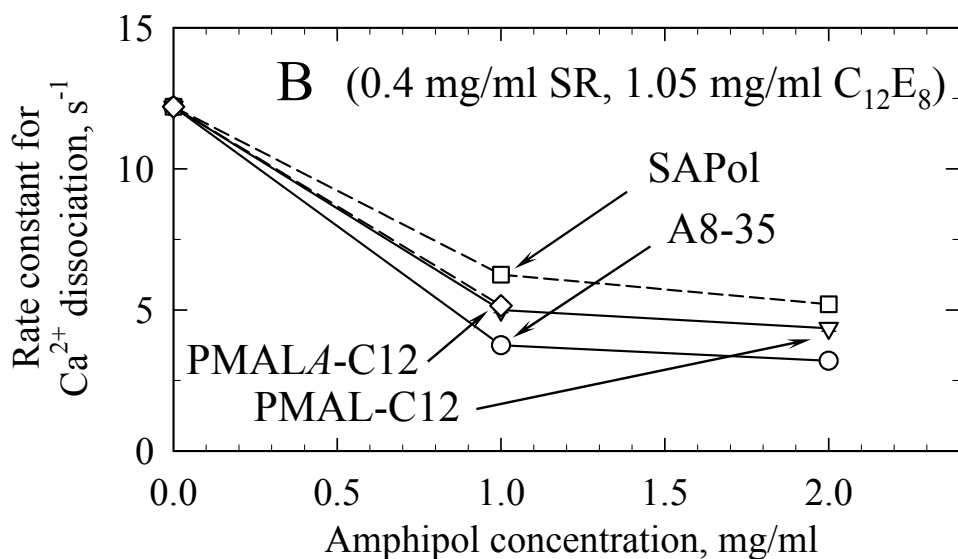
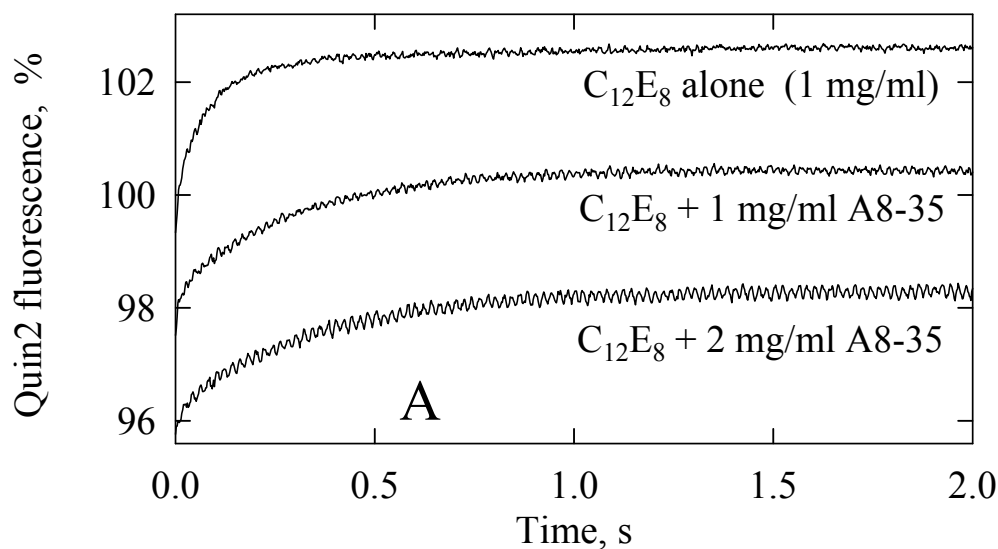
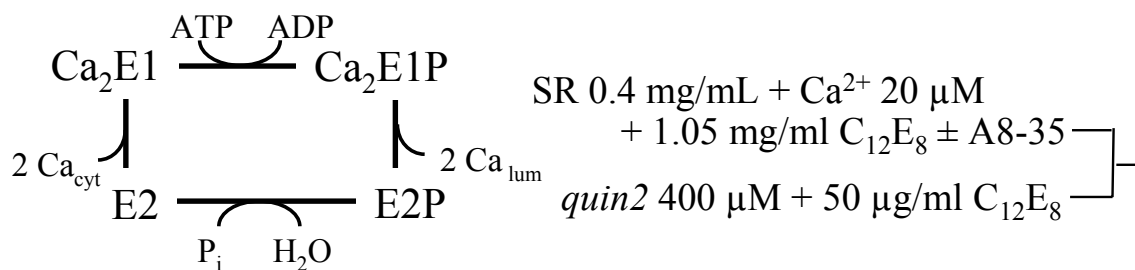


Figure 6. Amphipols also slow down Ca^{2+} dissociation from detergent-solubilized Ca^{2+} -ATPase



For Table of Contents use only:



Stability and Activity of a
Membrane Protein complexed by an
Amphiphilic Polymer

Ms: Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study, *by Martin Picard, Tassadite Dahmane, Manuel Garrigos, Carole Gauron, Fabrice Giusti, Marc le Maire, Jean-Luc Popot, and Philippe Champeil*

Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study

by Martin Picard, Tassadite Dahmane, Manuel Garrigos, Carole Gauron,

Fabrice Giusti, Marc le Maire, Jean-Luc Popot, and Philippe Champeil

Previously documented effects of APols on membrane protein function

Several studies have suggested that functional properties of membrane proteins are retained in the presence of APols: *i*) the polyacrylate-based, anionic APol A8-35 (Diagram 1A) alleviates detergent-induced perturbations of the allosteric properties of the nicotinic acetylcholine receptor (11); *ii*) the enzymatic activity of diacylglycerol kinase (DAGK) trapped by a zwitterionic amphipol, PMAL-C12 (Diagram 1C), is similar to that in lipid vesicles (12); *iii*) upon excitation by light, A8-35-trapped rhodopsin shifts from the dark state to the meta-II intermediate, as it does in rod outer segment disks (7); and *iv*) similarly, illumination of A8-35-trapped bacteriorhodopsin triggers its photocycle (Pocanschi *et al.*, *in preparation*). Intermediate cases have been described, in which some, but not all functional properties of a membrane protein appear to be preserved following trapping by APols (7).

Previously documented properties of A8-35 in solution

In standard buffers (*e.g.* ~100 mM NaCl, pH 7.5-9), pure A8-35 (mean molecular mass 8-10 kDa) self-assembles into small monodisperse particles with a molecular mass of ~40 kDa and a Stokes radius (R_s) of ~3 nm, in which most of the carboxylates are ionized and heavily hydrated (13, 16-17). However, particle size homogeneity depends on numerous factors, including details of the synthesis protocol and the pH of the buffers (17). This is of critical importance for many practical applications, because any tendency of pure APol particles to aggregate leads to the aggregation of protein/APol complexes handled under the same conditions (14-15).

The presence or absence of divalent cations is critical for the state of aggregation of amphipol A8-35 in the absence of detergent.

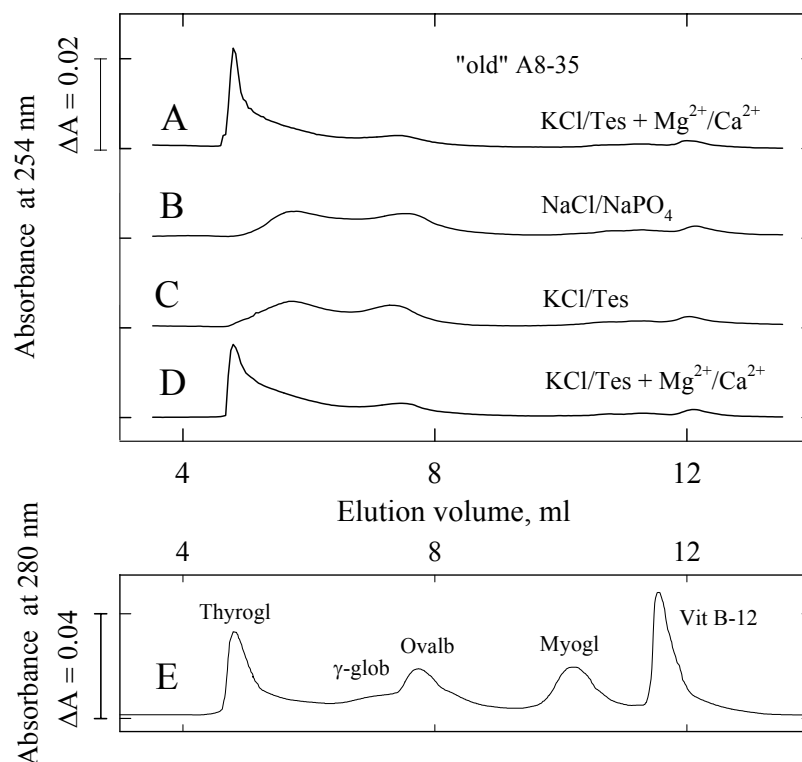


Figure S1. The presence or absence of millimolar divalent cations has a critical effect on the aggregation state of amphipol A8-35 in the absence of detergent. APol A8-35 (“old”, see Experimental Procedures) was suspended at 5 mg protein/ml in various buffers, and 100- μ l samples were subjected to chromatography on a ProteinPak HPLC column equilibrated and eluted with the same buffers; experiments were performed at room temperature (23°C). For the first experiment, the buffer consisted of 100 mM KCl, 1 mM Mg^{2+} , 0.5 mM Ca^{2+} and 20 mM Tes-NaOH at pH 7 (trace A). APol A8-35 formed very large aggregates eluting in the void volume of the column. We then systematically changed the composition of the buffer used for APol dilution, column equilibration and sample elution. Trace B shows that most of the very large aggregates disappeared if the original buffer was replaced by a buffer containing 100 mM NaCl and 20 mM NaPO_4 at pH 7.1 previously used in other HPLC analyses of this APol (14, 17). Almost all the A8-35 was able to enter the gel, although the chromatogram still revealed some size heterogeneity, some of the APol eluting with a Stokes radius close to 3 nm (by comparison with protein standards) and some with a larger Stokes radius. Increasing the pH from 7 to 8 had little effect on the chromatogram (data not shown). At pH 7, the presence or absence of phosphate or sodium in the elution buffer was of no importance, as shown by trace C, obtained with a buffer containing 100 mM KCl and 20 mM Tes-NaOH at pH 7. Large aggregates re-appeared when divalent cations were reintroduced into the buffer (trace D, 100 mM KCl, 1 mM Mg^{2+} , 0.5 mM Ca^{2+} and 20 mM Tes-NaOH at pH 7 again, as for trace A). The small peak eluting with the total volume (at about 12 ml) is probably a contaminant. Trace E: a mixture of R_s standards (same buffer as in D), comprised of thyroglobulin (670 kDa, $R_s = 8.6$ nm), γ -globulin (158 kDa, $R_s = 5.2$ nm), ovalbumin (44 kDa, $R_s = 2.8$ nm), myoglobin (17 kDa, $R_s = 1.9$ nm) and vitamin B₁₂ (1.35 kDa, $R_s = 0.85$ nm). Absorbance was measured at 254 nm for APol and 280 nm for standards.

Effect of Ca^{2+} on the turbidity of A8-35 and SAPol solutions

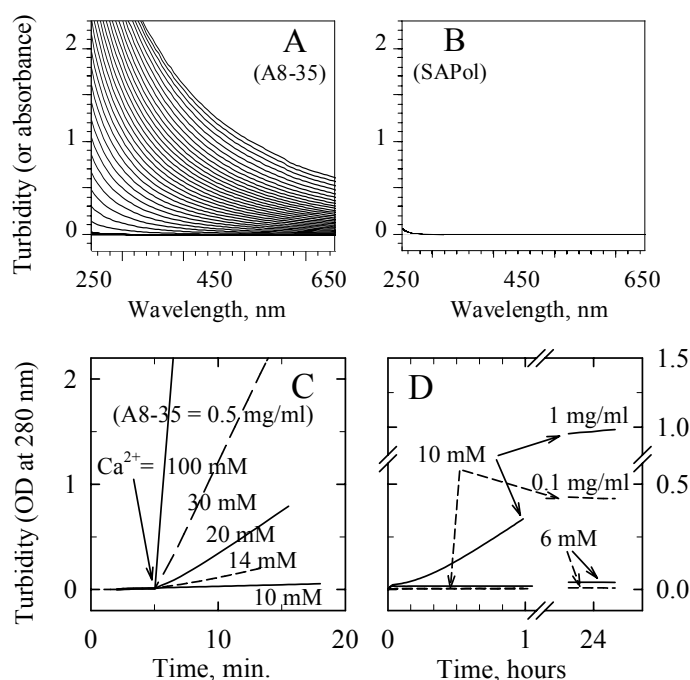


Figure S2. Effect of calcium on the turbidity of A8-35 and SAPol solutions. A8-35 (batch *FGH15*; Panel A) or SAPol (Panel B) was suspended at a concentration of 0.5 mg/ml in 100 mM NaCl and 20 mM Tris-HCl, pH 8 (20°C) in a spectrophotometer cuvette, with stirring. After 2-3 minutes, 30 mM Ca^{2+} was added (time zero), and turbidity spectra were recorded every minute. Panel C, changes over time in the turbidity at 280 nm of 0.5 mg/ml solutions of A8-35 (batch *FGH20*), following the addition of 10, 14, 20, 30 or 100 mM CaCl_2 . Panel D, changes over time in the turbidity at 280 nm of solutions of A8-35 at concentrations of 0.1 or 1 mg/ml, following the addition of 6 mM (no turbidity developed at all, over 24 hours) or 10 mM CaCl_2 (continuous line, 1 mg/ml; dashed line, 0.1 mg/ml: in the latter case, turbidity was not observed until the second day).

Comments. At very high (30 mM) concentrations of Ca^{2+} (or Mg^{2+}) and a moderate (0.5 mg/ml) concentration of A8-35, massive aggregation developed over time, making the polymer suspension turbid (Fig. S2, A). Using PMAL-C12, aggregation occurred even more rapidly than with A8-35 (not shown). Under these conditions, SAPol solutions showed no increase in turbidity (Fig. S2, B), whereas PMALA-C12 aggregated, but to a lesser extent than PMAL-C12 (not shown).

The rate at which turbidity developed depended heavily on Ca^{2+} concentration: when $[\text{Ca}^{2+}]$ was decreased from 30 mM to 10 mM (a factor of 3), this rate was reduced by a factor of almost 100 (Fig. S2, C). Thus, A8-35 turbidity becomes a serious problem only at Ca^{2+} concentrations exceeding a few mM. It can also be minimized by working with low concentrations of polymer (Fig. S2, D): turbidity at 10 mM Ca^{2+} develops over tens of minutes with 1 mg/ml A8-35, whereas at 0.1 mg/ml A8-35 it develops only very slowly (hours or days). Turbidity at a concentration of 6 mM Ca^{2+} was negligible in all cases. Thus, the small but already detectable effect of 5 μM Ca^{2+} on the behavior of A8-35 particles upon SEC (Fig. 2) thus indicates that calcium-induced polydispersity of the particles is a more serious concern than turbidity.

Note that turbidity did not develop with 10 or 100 mg/ml of amphipol (not shown): for 100 mg/ml, the concentration of carboxylic groups is 300 mM - much higher than the total concentration of added Ca^{2+} - so even extensive Ca^{2+} binding would decrease the concentration of negatively charged carboxyl groups only moderately. Sequestration of Ca^{2+} by A8-35 was assessed, based on murexide absorbance measurements (13). At 2 mg/ml A8-35 (6 mM carboxyl groups) and 2 mM total Ca^{2+} , the concentration of free Ca^{2+} was ~ 1.2 mM, corresponding to a dissociation constant of ~ 8 mM, based on the (simplistic) assumption of a single class of sites.

Possible physical chemical mechanisms for the aggregating effect of divalent cations

Two non-mutually exclusive physical chemical mechanisms may be involved in the calcium-induced aggregation of A8-35. Electrostatic screening of negative charges by Ca^{2+} may contribute to A8-35 aggregation. Indeed, high ionic strength is sufficient, in the absence of divalent cations, to induce the aggregation of (larger) amphipathic polymers (30), and of A8-35 itself or membrane protein/A8-35 complexes (13-14; D. Charvolin and Y. Gohon, unpublished data). Particle aggregation under such circumstances may involve the sharing of hydrophobic chains by different particles, a mechanism that has been suggested to account for the aggregation of other amphipathic polymers (31-33). Alternatively, or additionally, calcium ions complexed by two carboxylates from different APol particles may also drive aggregation. The presence of sulfonate groups in SAPol probably hinders aggregation because it increases electrostatic repulsion between particles.

**Ca²⁺ dissociation from detergent-solubilized Ca²⁺-ATPase,
as measured with a quin2 assay.**

SR 0.4 mg/mL + Ca²⁺ 20 μM ± C₁₂E₈ }
 quin2 400 μM ± C₁₂E₈ }
 (100 mM KCl, 50 mM Mops-Tris, Mg²⁺=0, pH 7, 20°C, λ_{ex}=312 nm/MTO 531)

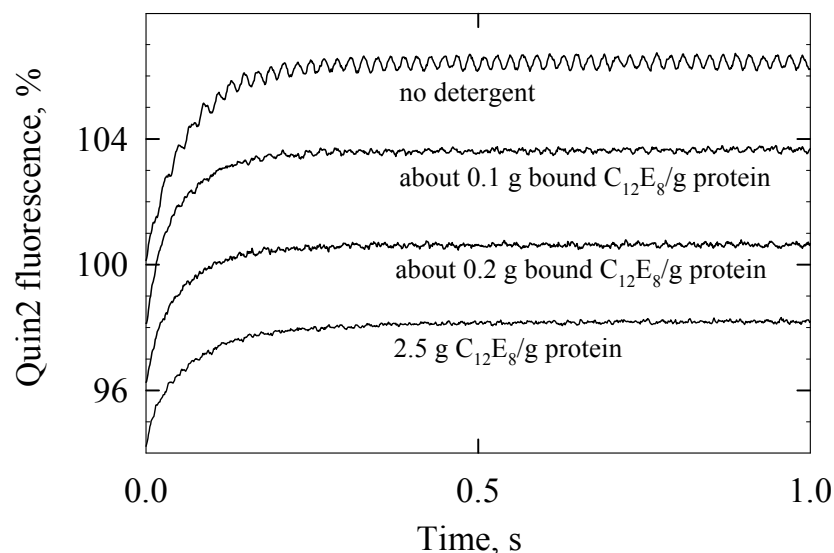


Figure S3. Ca²⁺ dissociation from detergent-solubilized Ca²⁺-ATPase, as measured with a quin2 stopped-flow assay

SR membranes (0.4 mg protein/ml in the SR syringe, equilibrated with a total of 20 μM Ca²⁺) were mixed volume for volume with quin2 (at a concentration of 400 μM in the quin2 syringe). Changes in quin2 fluorescence were monitored with an excitation wavelength of 312 nm, and with a green filter (MTO DA531) in the emission pathway. The medium otherwise contained 100 mM KCl and 50 mM MOPS-Tris, at pH 7 and 20 °C, and C₁₂E₈ at various concentrations in the SR and quin2 syringe: in mg/ml, 0 and 0 (top trace), 0.05 and 0.01 (second trace from the top), 0.1 and 0.02 (third trace from the top), or 1.05 and 0.05 (bottom trace), respectively. Based on the partition coefficient of C₁₂E₈ between water and SR membranes (*Andersen et al., 1983*), we estimate that 0, 0.1, 0.2 or 2.5 g C₁₂E₈/g protein interacted with the SR constituents both before and after mixing. The fluorescence signal, considered to be indicative of Ca²⁺ dissociation from ATPase, was normalized to its initial value, and the various traces were shifted slightly with respect to each other, for clarity. Note that excess free Ca²⁺, present along with the initial ATPase-Ca²⁺ complex, also binds to quin2. However, this binding occurs within the dead time of the device (~3 ms), so the time-course of the observed rise in quin2 fluorescence only reflects the rate of Ca²⁺ dissociation from the Ca²⁺-protein complex.

At the two intermediate C₁₂E₈ concentrations illustrated here (a non-solubilizing concentration and a concentration close to the beginning of solubilization, respectively; see *e.g. ref. 29* in the main text), single exponential analysis suggested a moderate increase in the rate constant for the rise in quin2 fluorescence (analyzed as a single exponential), accompanied by a moderate decrease in amplitude. At the highest C₁₂E₈ concentration, corresponding to complete solubilization, the rate constant returned to the value in SR membranes, whereas the amplitude continued to decrease, down to half that in the absence of detergent. Rate constants were 15.6, 20.7, 18.9, and 14.3 s⁻¹ at 0, 0.1, 0.2 and 2.5 g C₁₂E₈ per g protein, respectively, but the single exponential fit was not very good at the two intermediate C₁₂E₈ concentrations. The decrease in amplitude in the presence of detergent may partly result from a decrease in the affinity of the ATPase for Ca²⁺ (see *Takisawa & Makinose, 1981; Silva & Verjovski-Almeida, 1983; Lund & Møller, 1988; Michelangeli et al., 1990; de Foresta et al., 1994*). Alternatively, we currently favor the hypothesis that the roughly halved amplitude in the presence of excess detergent implies that, in solubilized ATPase, Ca²⁺ dissociates very rapidly from site II, close to

Glu³⁰⁹ (this dissociation probably occurs within the dead time of our measurements, a few milliseconds), but at an almost unaltered rate from site I, close to Glu⁷⁷¹ (work in preparation).

Possible implications of the results shown in *Figure S3* for the “flickering gate” mechanism

The “flickering gate” mechanism accounts for the apparently monophasic dissociation of two Ca²⁺ ions in Ca²⁺-free media by assuming that (i) there is a single rate-limiting step for Ca²⁺ dissociation from Ca²⁺-ATPase (now attributable to opening of the E309 gate), and (ii) exchange from one site to the other (with equal probabilities to bind to one or the other site) is *not* rate-limiting (see Forbush, 1987, 1988; Orlowski & Champeil, 1991). This mechanism predicts that if the dissociation of one Ca²⁺ ion (from site II) becomes very fast (say, in the presence of detergent), the overall dissociation of the two Ca²⁺ ions should also become very fast. The interpretation we suggest above for the roughly halved amplitude of the quin2 signals in the presence of excess detergent (Ca²⁺ bound to site I dissociates fairly slowly in the presence of detergent, despite the acceleration of Ca²⁺ dissociation from site II due to solubilization) contradicts this prediction of the original “flickering gate” hypothesis, by excluding the possibility that the opening of a single gate at site II is the only rate-limiting step for Ca²⁺ dissociation. However, this interpretation is consistent with recent data showing that, after mutation of E309, Ca²⁺ binding at site II is lost, while Ca²⁺ initially bound to site I still dissociates reasonably slowly (Inesi *et al.*, 2004). Both those data obtained with mutated ATPase and the ones obtained here with detergent probably imply that the original flickering gate mechanism (whereby the two Ca²⁺ ions exit through a single path (or gate) *and* exchange is not rate-limiting), if maintained, should be modified to include *two* rate-limiting steps rather than one: one for dissociation from site II (at the gate), and a second for the exchange of the residual Ca²⁺ ion between the two sites.

Additional references

- Andersen, J. P., le Maire, M., Kragh-Hansen, U., Champeil, P., and Møller, J. V. (1983) Perturbation of the structure and function of a membranous Ca²⁺-ATPase by non-solubilizing concentrations of a non-ionic detergent, *Eur. J. Biochem.* 134, 205-214.
- de Foresta, B., Henao, F., and Champeil, P. (1994) Cancellation of the cooperativity of Ca²⁺ binding to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase by the non-ionic detergent dodecylmaltoside, *Eur. J. Biochem.* 223, 359-369.
- Forbush, B. (1987) Rapid release of ⁴²K or ⁸⁶Rb from two distinct transport sites on the Na,K-pump in the presence of Pi or vanadate, *J. Biol. Chem.* 262, 11116-11127.
- Forbush, B. (1988) Overview: occluded ions and Na, K-ATPase, in *Progress. Clin. Biol. Res.* 268A, 229-248 (*"The Na⁺-K⁺-pump"*, part A, Skou, J. C., Norby, J. G., Esmann, M., and Maunsbach, A. B. Eds, A. Liss, Inc., New York).
- Inesi, G., Ma, H., Lewis, D., and Xu, C. (2004) Ca²⁺ occlusion and gating function of Glu309 in the ADP-fluoroaluminate analog of the Ca²⁺-ATPase phosphoenzyme intermediate, *Biochemistry* 279, 31629-31637.
- Lund, S., and Møller, J. V. (1988) Biphasic kinetics of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and the detergent-solubilized monomer, *J. Biol. Chem.* 263, 1654-1664.
- Michelangeli, F., Orlowski, S., Champeil, P., Grimes, E. A., East, J. M., and Lee, A. G. (1990) Effects of phospholipids on binding of calcium to (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase, *Biochemistry* 29, 8307-8312.
- Orlowski, S., and Champeil, P. (1991) Kinetics of calcium dissociation from its high-affinity transport sites on sarcoplasmic reticulum ATPase, *Biochemistry* 30, 352-361.
- Scofano, H., Barrabin, H., Inesi, G., and Cohen, J.A. (1985) Stoichiometric and electrostatic characterization of calcium binding to native and lipid-substituted adenosinetriphosphatase of sarcoplasmic reticulum, *Biochim. Biophys. Acta* 819, 93-104.
- Silva, J. L., and Verjovski-Almeida, S. (1983) Self-association and modification of calcium binding in solubilized sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase, *Biochemistry* 22, 707-716.
- Takisawa, H., and Makinose, M. (1981) Occluded bound calcium on the phosphorylated sarcoplasmic transport ATPase, *Nature* 290, 271-273.

Conclusions, perspectives

Conclusions, perspectives

Tentons d'abord de résumer cette thèse, avant d'esquisser quelques pistes futures possibles.

Au titre de « premiers travaux » (Chapitre IV), j'ai d'abord participé à l'étude des effets d'une coupure protéolytique de l'ATPase au niveau de la boucle reliant le domaine A au segment transmembranaire M2 (Lenoir et al. 2004a). Nous avons confirmé que le domaine A avait un rôle primordial pour le fonctionnement correct de l'ATPase, en particulier dans l'étape de déphosphorylation. Par la suite, des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que les résidus très conservés TGES de ce domaine étaient particulièrement impliqués dans la déphosphorylation de l'ATPase (Clausen et al. 2004). La publication de la structure cristallographique de complexes fluorés supposés analogues à l'état de transition adopté par l'ATPase au moment de sa déphosphorylation a permis de conclure définitivement quant aux mécanismes mis en jeu pendant celle-ci : TGES positionne la molécule d'eau nécessaire à l'hydrolyse du groupement phosphate (Olesen et al. 2004; Toyoshima et al. 2004). Nous avons aussi montré que la coupure par la protéinase K influence également d'autres étapes du cycle : elle affecte légèrement l'affinité avec laquelle le Ca^{2+} se fixe, et ralentit plus significativement la transition $\text{E2} \rightarrow \text{E1Ca}_2$. Cela peut sans doute aussi être compris grâce aux nouvelles structures de l'ATPase désormais disponibles, qui montrent que les mouvements du domaine A affectent les domaines transmembranaires par l'intermédiaire des boucles le reliant aux segments M1, M2 et M3 : la déstabilisation du domaine A aura donc des conséquences sur la fixation des ions Ca^{2+} sur l'ATPase.

J'ai ensuite participé à l'étude du rôle de la boucle L6-7 sur le fonctionnement de l'ATPase, pour préciser son implication dans la fixation du Ca^{2+} . Nous avons montré que cette boucle a un rôle important pour la fixation de Ca^{2+} mais aussi pour d'autres étapes du cycle catalytique, dont par exemple la déphosphorylation ou la fixation des nucléotides (Lenoir et al. 2004b). Il apparaît donc que cette boucle a un rôle dans la coordination des événements cytosoliques et membranaires. Les expériences combinant phosphorylation de préparations membranaires, éventuellement sur des échelles de temps plus courtes que la seconde, et séparation électrophorétique, ont donc finalement bien permis de caractériser les propriétés fonctionnelles de nos ATPases, y compris après l'expression en système hétérologue, la purification et la reconstitution en membranes que réalisait Guillaume Lenoir dans le groupe de M. le Maire. Les niveaux de pureté des protéines produites se sont également avérés assez élevés pour que puissent être mises en œuvre des mesures de fluorescence intrinsèque. Nous avons ainsi pu mesurer, par exemple, l'affinité vraie pour le Ca^{2+} de l'ATPase mutée dans la boucle L6-7. Par la suite, le même protocole de purification nous a permis d'effectuer de semblables mesures de fluorescence intrinsèque pour des ATPases mutées sur des résidus impliqués dans la fixation du Ca^{2+} (Glu309, Glu771, Asp800), ou mutées sur le seul résidu Trp situé dans un domaine cytosolique (Trp552) (Lenoir et al. soumis à *Biochemistry*).

Depuis ces expériences, le système de purification des ATPases exprimées a encore été optimisé. Initialement basés sur l'expression d'une protéine marquée avec un Tag Histidine et sur une purification sur colonne de Nickel-NTA, les protocoles sont maintenant basés sur une étape de purification, sur colonne de Biotine, d'ATPases fusionnées à un domaine accepteur de Biotine, et permettent de produire des ATPases encore plus actives, en quantités d'ailleurs suffisantes pour le criblage de conditions de cristallisation ((Jidenko et al. 2005), et Jidenko et al., en préparation). On peut espérer que l'étude fonctionnelle éventuelle de nouveaux mutants en sera facilitée d'autant.

Mon effort principal (chapitre V) a ensuite concerné l'étude fonctionnelle de certaines formes de l'ATPase qui avaient bien voulu se prêter à la cristallisation, mais dont la structure cristalline semblait en partie paradoxale. Nous avons montré que les conditions utilisées pour la cristallisation pouvaient en être responsables.

Ainsi, la structure cristalline obtenue en présence d'AMPPCP, structure censée représenter la conformation adoptée par l'enzyme au moment de la fixation du nucléotide, s'est révélée être une structure où les ions calcium semblent occlus: le Ca^{2+} ne pourrait s'en dissocier ni d'un côté ni de l'autre côté de la membrane (Sørensen et al. 2004; Toyoshima and Mizutani 2004). Or les données bibliographiques semblaient en désaccord avec une telle occlusion, et nous avons confirmé qu'une contradiction apparente existait bien entre structures cristallines publiées et faits expérimentaux. Des techniques d'études biochimiques nous ont permis d'en suggérer la cause: en présence de concentrations élevées de Ca^{2+} , c'est-à-dire dans les conditions de la cristallisation, l'ATPase ayant lié de l'AMPPCP adopte une structure qui probablement diffère de la structure réelle de l'ATPase en solution (même si, par chance, la structure adoptée est une structure très intéressante, la structure de l'état immédiatement voisin dans le cycle catalytique (Picard et al. 2005b)). La raison de cet "artéfact" est sans doute le type de métal lié dans le site nucléotidique. L'un des objectifs de mon prochain séjour post-doctoral au Danemark sera d'établir définitivement cela, pour que soit corrigée la structure cristallographique et qu'elle ne soit désormais plus décrite comme représentant l'ATPase ayant fixé du Mg.AMPPCP, mais comme représentant l'ATPase ayant lié un substrat différent: le Ca.AMPPCP.

La question de la «vraie» structure que l'ATPase adopte dans des conditions normales, en présence de nucléotide et de concentrations micromolaires de Ca^{2+} , reste une question non résolue. A défaut de disposer d'une telle structure de la chaîne polypeptidique, nous avons essayé de discuter de la conformation que pourrait y adopter le nucléotide. Certains résultats publiés semblent privilégier l'idée que le nucléotide puisse adopter dans des conditions normales une conformation repliée (différente de la conformation étendue décrite dans le cristal). Mais cette hypothèse ne s'appuie que sur des données expérimentales indirectes. La conformation adoptée par le nucléotide fixé à l'ATPase pourrait probablement être déterminée par des techniques de RMN, comme la technique de ROESY transférée. Cette technique permet de définir la conformation d'un ligand lié, lorsqu'il est en équilibre avec une forme libre, même en excès. De telles mesures, naguère réalisées dans le service (thèse de F.André, 1993) avaient montré que l'AMPPCP adopte une conformation repliée lorsqu'il se fixe sur l'ATPase en absence de Ca^{2+} ; il serait donc potentiellement intéressant de les répéter en présence de Ca^{2+} micromolaire. Pour plus de précisions, la cristallographie restera cependant vraisemblablement le meilleur recours, mais il faudra pour cela contourner l'instabilité de l'ATPase- Ca^{2+} dans les conditions actuellement utilisées pour la cristallisation.

A défaut de savoir comment l'AMPPCP se fixe vraiment sur la conformation E1, j'essaierai pendant mon stage post-doctoral de cristalliser une autre forme d'ATPase portant l'AMPPCP: une ATPase ayant réagi, en présence de Ca^{2+} , avec l'AMPPCP et le fluoroaluminate. Ce complexe, dont on sait qu'il peut se former et qu'il occlut le Ca^{2+} lui aussi, comme le complexe E1.ADP. AlF_4 (Inesi et al. 2004), pourrait avoir une structure analogue à l'ATPase phosphorylée en E1P quand celle-ci porte en plus un nucléotide triphosphate fixé, régulateur. Ce projet a été proposé initialement pour tenter de comprendre pourquoi la fixation (à faible affinité) d'ATP sur l'ATPase phosphorylée active la transition entre $\text{Ca}_2\text{E1P}$ et E2P. Puisque le Ca^{2+} y est occlus, cette forme E1.AMPPCP. AlF_4 est probablement beaucoup moins sujette à dénaturation, et sa cristallisation devrait pouvoir être possible à des concentrations «raisonnables» en Ca^{2+} : on peut donc peut-être espérer y voir l'AMPPCP fixé (mais en position régulatrice) avec du Mg^{2+} comme cofacteur, et non pas du

Ca²⁺ (ou sans métal, si la forme régulatrice est la forme libre, comme pour la fixation d'ATP sur E2P (McIntosh et al. 1991).

J'ai aussi montré, dans le chapitre V, qu'en présence des inhibiteurs de l'ATPase jusqu'ici utilisés pour permettre la cristallisation de SERCA en absence de Ca²⁺, l'ouverture des sites de transport vers la lumière du réticulum était bloquée (Picard et al. 2005c). Ici aussi, il semble donc que les astuces employées pour contourner l'instabilité en absence de Ca²⁺ de l'ATPase solubilisée et permettre sa cristallisation ne soient pas sans incidence sur la structure cristalline finalement obtenue. Même la structure de E2 est d'ailleurs peut-être un peu affectée par la présence de la TG, à en juger par nos mesures de protéolyse décrites dans la Figure 4 du chapitre III. Toutefois, les deux structures disponibles à l'heure actuelle qui ont été obtenues en absence de Ca²⁺ et en présence de fluorure d'aluminium ou de fluorure de magnésium, qui suggèrent toutes deux des sites de transport effectivement fermés (avec sans doute des protons occlus), n'ont sans doute pas lieu d'être corrigées, car nous avons montré que pour les mêmes complexes en absence d'inhibiteur, l'accès luminal aux sites de transport est déjà fermé. Nos résultats suggèrent que seule une structure obtenue en présence de fluorure de béryllium pourra mimer la conformation dans laquelle SERCA1a phosphorylée ouvre ses sites du côté luminal. Cette structure n'a pas encore été déterminée. Un résultat positif de notre travail est de nous encourager à cristalliser cette forme E2.BeFx -mais en absence d'inhibiteurs du type de la thapsigargine. La cristallisation d'une telle forme constitue un deuxième objectif de mon stage post-doctoral.

Il existe déjà plusieurs exemples de processus de cristallisation sélectionnant une conformation parmi plusieurs qui, en solution, sont en équilibre. Dans les cas favorables, la cristallisation sélectionne une conformation importante pour l'activité de la protéine. C'est le cas par exemple de l' α -chymotrypsine. Dans certains cas, deux conformations différentes peuvent être trouvées toutes les deux dans une même maille cristalline (Kim et al. 2002). Il arrive aussi que les conditions de cristallisation sélectionnent une conformation extrême. L'exemple du canal potassium voltage dépendant KvAP (canal responsable, dans le neurone, du retour au potentiel de repos après dépolarisation de la membrane) est à cet égard particulièrement révélateur. Sa cristallisation a permis à MacKinnon et son équipe de proposer un mécanisme remarquable d'ouverture du canal, modèle qui remet totalement en cause le dogme qui prévalait jusqu'alors. Mais ce modèle est très controversé car il est contredit par de nombreuses autres données expérimentales : de l'avis de ses contradicteurs, les conditions de cristallisation ont pu figer une conformation particulière, artéfactuelle, due à l'emploi d'anticorps pour stabiliser des domaines très mobiles. Nos travaux ne sont donc certes pas les premiers à suggérer la possibilité d'artéfacts, et tout cela nous incite à garder la tête froide face aux structures cristallographiques. On pourrait citer Jeremy Knowles: «making a model of a horse from photographs does not necessarily tell us how fast it can run» (Gutfreund and Knowles 1967). Mais il est vrai que lui-même est revenu en arrière quelques années plus tard, lorsqu'il écrivit: « Seeing is believing » ! (Knowles 2003) ...

La cristallisation reste malgré tout bien sûr une technique incontournable pour la compréhension des phénomènes biologiques, et bien souvent l'activité de l'enzyme dans le cristal est la même qu'en solution (Fersht 1999). Mais peut-être, et tout particulièrement pour des enzymes comme l'ATPase dont l'activité requiert de très amples changements conformationnels au cours du cycle, un partenariat étroit entre fonctionnalistes et structuralistes est-il indispensable pour interpréter les résultats structuraux et, dans certains cas, pointer du doigt des informations que le cristal est susceptible de cacher ou au contraire de montrer, en partie à tort.

Finalement, dans le chapitre VI de cette thèse, j'ai décrit nos efforts pour aider à la manipulation raisonnée des protéines membranaires solubilisées par les détergents et stabilisées par les amphipols. Les amphipols sont des polymères amphiphiles initialement conçus pour remplacer les détergents. Ils ont été mis au point en 1996 dans les laboratoires de Christophe Tribet et de Jean-Luc Popot, et ont prouvé leur efficacité à maintenir stables en solution de nombreuses protéines membranaires.

Dans un premier temps nous avons voulu revenir sur le fait que les amphipols sont de piètres agents solubilisants. Pour cela, nous avons comparé les propriétés de l'amphipol A8-35, l'amphipol le mieux caractérisé à ce jour, et celles d'un autre polymère amphiphile dérivé du pullulane, réputé capable de solubiliser des membranes bactériennes. Nous avons confirmé que le A8-35 ne pouvait pas solubiliser les membranes de réticulum, même sur le long terme (quelques jours), mais nous sommes arrivés au même résultat concernant le pullulane modifié (Picard et al. 2004). Ce résultat illustre probablement la propriété bien connue des tensioactifs à solubiliser avec plus ou moins de facilité des types de membranes différents ; l'emploi de détergents classiques efficaces pour la solubilisation de protéines particulières reste donc indispensable pour les premières étapes d'extraction de ces protéines hors de leur environnement lipidique, avant addition éventuelle d'amphipols. En marge de ces travaux, nous avons mis en évidence la capacité de ces amphipols à prévenir la floculation des membranes au cours du temps. Ce résultat pourrait trouver des applications concrètes, par exemple dans les cas où une suspension de protéines membranaires doit être maintenue en solution pendant des temps relativement longs. Signalons d'ailleurs que des polymères dérivés de polysaccharides se sont révélés efficaces pour améliorer la stabilité de liposomes vectorisant des médicaments vers leurs tissus cibles. En décorant les liposomes d'une interface très hydrophile, ces polymères permettent de contrer les phénomènes d'opsonisation ou de dégradation enzymatique, et les propriétés de protection contre la floculation que nous avons mises en évidence ne sont sans doute pas non plus étrangères à cette stabilisation.

Nous nous sommes ensuite intéressés à une contrepartie apparemment embarrassante, déjà observée en 2000, à la stabilisation de SERCA1a par l'amphipol A8-35 : la stabilisation s'accompagne d'une inhibition (heureusement réversible) de l'activité ATPasique de SERCA1a. Nous avons comparé l'effet de différents types de polymères amphiphiles afin d'expliquer, voire de circonscrire, cet effet inattendu.

Nous avons d'abord montré que la présence de concentrations importantes de Ca^{2+} explique l'agrégation de l'amphipol A8-35 observée en 2000. Un amphipol sulfonaté, synthétisé dans le laboratoire de Jean-Luc Popot, s'est heureusement montré insensible à la concentration de Ca^{2+} présente dans le milieu, jusqu'à 30 mM.

Ce même amphipol sulfonaté inhibe lui aussi l'activité ATPasique de SERCA de façon significative, mais seulement à dose plus élevée. Des doses plus fortes de cet amphipol sulfonaté sont également nécessaires pour protéger la protéine lorsqu'elle est extraite de son environnement lipidique et diluée en absence de détergent, ou bien lorsqu'elle est gardée en solution de détergent en absence de Ca^{2+} . Ces deux cas de figures sont connus pour engendrer une inactivation irréversible de l'ATPase- Ca^{2+} (le premier cas est général à toutes les protéines membranaires). Nous avons donc mis en évidence une certaine corrélation entre la protection conférée par les amphipols vis-à-vis d'une inactivation irréversible de SERCA, et l'inhibition réversible qu'ils induisent sur son activité. Au-delà, nous avons montré qu'il semblait y avoir également corrélation avec un événement assez différent, la capacité des amphipols à ralentir la vitesse de dissociation du Ca^{2+} hors de ses sites intramembranaires. Cette observation nous a conduit à la conclusion que l'effet protecteur de l'amphipol, c'est à dire le maintien des hélices transmembranaires, s'accompagnait sans doute d'une gêne dans la respiration de l'architecture polypeptidique indispensable tant à l'ouverture des sites Ca^{2+} ,

localisés au sein des hélices transmembranaires, qu'à l'activité de transport de la protéine. Cette tentative d'interprétation générale a l'avantage d'expliquer pourquoi l'activité de certaines autres protéines membranaires peut ne pas souffrir de l'inhibition réversible par les amphipols observée pour l'ATPase : il suffit que l'activité catalytique de ces protéines ne soit pas dépendante de leur «respiration».

Nous avons discuté du fait que la dissociation du Ca^{2+} à partir d'une ATPase solubilisée était ralentie en présence d'amphipols, mais nous ne nous sommes pas tellement étendus sur l'effet du seul détergent sur cette vitesse de dissociation. En préliminaire à ces mesures de dissociation en présence d'amphipol, (voir chapitre 6, Figure 8), nous avons en effet réalisé des expériences contrôles dans lesquelles nous avons mesuré la vitesse de dissociation du Ca^{2+} à partir d'une ATPase solubilisée mais en absence d'amphipol. Dans ces expériences, la vitesse de dissociation du Ca^{2+} était mesurée en suivant les variations de fluorescence du quin2. En présence de détergent, nous avons constaté que la variation de fluorescence du quin2 avait certes une constante de vitesse similaire à ce que l'on observait en absence de détergent, mais que l'amplitude du signal était deux fois plus faible. Une interprétation serait qu'en présence de détergent seul, le Ca^{2+} fixé au site II se dissocie tellement vite que l'on ne puisse plus détecter le signal de fluorescence correspondant. Cette dissociation rapide du Ca^{2+} du site II serait la conséquence de la microviscosité locale faible de l'interface protéine/détergent, qui permettrait des mouvements rapides pour la chaîne latérale de E309, supposée bloquer la dissociation de l'ion Ca^{2+} fixé au site II. Mais cette viscosité ne serait pas suffisante pour accélérer la dissociation de l'ion Ca^{2+} du site I, qui est enfoui plus profondément. C'est la dissociation de cet ion fixé au site I qui serait ralentie par l'amphipol, par un effet « Gulliver », l'étouffement progressif par les amphipols de la « respiration » de la protéine.

Notons au passage que dans la théorie de la dissociation séquentielle des deux ions Ca^{2+} via une unique porte oscillante, la grande fréquence d'ouverture de la porte du site II devrait entraîner une dissociation très rapide des *deux* ions, et non pas d'un seul. Il ne serait donc pas complètement injustifié de mettre un bémol à ce modèle de porte oscillante...

Ultimes commentaires

Les travaux que nous avons présentés avaient des objectifs différents, ils ont été réalisés dans des contextes divers mais ils ont en commun de nous faire déboucher sur la *dynamique* de l'ATPase en solution.

Les mouvements des segments transmembranaires sont couplés avec les événements ayant lieu du côté cytosolique grâce au domaine A, qui effectue de larges mouvements de rotation, et grâce à la boucle L6-7, par un mécanisme qui n'est pas encore clairement défini (probablement via des liaisons hydrogènes avec les segments transmembranaires). Ces mouvements définissent des transitions conformationnelles de très grande amplitude (par exemple, rotation du domaine A de 110° parallèlement à la membrane). Dans le cas de la fixation ou de la dissociation des ions Ca^{2+} , les modèles actuels se contentent de décrire les états extrêmes de l'enzyme, formes « E1Ca₂ » ou « E2 ». Pourtant, il est clair que des formes intermédiaires existent, notamment à pH neutre ou alcalin, où la faible concentration des protons disponibles ne pourra sans doute pas, en absence de Ca^{2+} , stabiliser une forme du type E2. Nous avons mentionné, dans le chapitre III, les expériences que nous faites dans le but de déterminer la séquence des événements ayant lieu lors de la transition $\text{Ca}_2\text{E1} \rightarrow \text{E2}$, en

comparant les variations de fluorescence des Trp et les variations de fluorescence du FITC lors de la dissociation des ions Ca^{2+} par le quin2. Les résultats montrent que certains événements (détectés par les résidus Trp) se produisent dans les segments transmembranaires avant que d'autres, révélés par le FITC, ne se produisent à plus grande distance. Comprendre ces états intermédiaires reste à faire, et ce n'est peut-être pas sans importance pour la description du cycle catalytique de l'ATPase, qui physiologiquement fonctionne à des pH bien supérieurs à pH 6.

Les premières étapes de réorganisation membranaire qui suivent ou permettent la dissociation des deux ions calcium (que ce soit du côté du cytosol ou du côté de la lumière du réticulum sarcoplasmique) passent sans doute, tout comme certaines autres étapes du cycle, par un mouvement de gonflement transitoire de la section transmembranaire de l'ATPase. Ces mouvements de gonflement, que l'on a qualifiés de « respirations », sont *a priori* des mouvements de plus faible amplitude que les grandes transitions conformationnelles évoquées plus haut, mais encore relativement lents. Nous avons vu précédemment que les amphipols inhibent le fonctionnement de l'ATPase par un mécanisme que l'on a postulé être un blocage des mouvements de respiration. Cet "étouffement" par les amphipols des mouvements de la protéine a été baptisé effet Gulliver, et il permettrait d'expliquer la corrélation entre protection conférée par le polymère et inhibition de l'activité ATPasique, et d'expliquer aussi pourquoi les amphipols inhibent l'activité de SERCA1a mais n'inhibent pas nécessairement certaines autres protéines membranaires. Mais nous devons bien admettre que cette idée de respiration n'a pas encore débouché sur des expériences susceptibles de la confirmer ou de l'infirmier, que ce soit dans le cas particulier des amphipols, ou dans un contexte plus général.

Une première piste pour tenter de réaliser ce type de mesures pourrait néanmoins consister à mesurer les variations de *polarisation* de fluorescence d'une sonde qui se fixerait dans les segments transmembranaires. Le groupe de Giuseppe Inesi a montré que la sonde NCD4 se fixait dans une région sinon transmembranaire, du moins proche des segments transmembranaires (Sumbilla et al. 1991). Une telle sonde pourrait se révéler utile pour des mesures de temps de corrélation rotationnelle. Toutefois la durée pendant laquelle il est possible d'observer la fluorescence de cette sonde après excitation est très courte (comme pour tous les fluorophores), guère plus de quelques nanosecondes. Pour explorer des gammes de temps supérieures, il faudra peut-être passer à des mesures de polarisation de la *phosphorescence* d'autres sondes, extrinsèques (Mueller et al. 2004), voire même de la phosphorescence des résidus Trp eux-mêmes (Broos et al. 2000).

Une autre technique d'étude de la « respiration » des protéines pourrait consister à étudier l'extinction par l'acrylamide de la fluorescence des résidus Trp. Cette idée, proposée par Eftink et Ghiron, suppose que pour des résidus réellement enfouis, la capacité de l'acrylamide à éteindre leur fluorescence est directement dépendante des « défauts » de compacité induits par la respiration de la protéine (Eftink and Ghiron 1975). C'est là une technique simple, qui pourrait mériter quelques essais ; cependant, sa validité est loin d'être unanimement acceptée (voir par exemple (Calhoun et al. 1986)).

Une autre piste pourrait être l'étude des vitesses d'échange des protons amide du squelette peptidique. Si une étude par RMN est sans doute hors de portée, on pourrait penser à des études par spectroscopie infra-rouge de la vitesse de cet échange; de semblables études ont déjà été bien balisées, notamment en utilisant comme protéine-test l'ATPase H^+/K^+ (Vigano et al. 2004). Leur extension à l'ATPase solubilisée en présence d'amphipol se heurte cependant au fait que l'amphipol A8-35 possède lui-même un certain nombre de groupe NH dont l'absorption risque de masquer l'absorption des groupes NH peptidiques que l'on aimerait voir s'échanger. On pourrait alors tenter de travailler avec le pullulane modifié, qui n'a pas de tels groupes NH additionnels. Il resterait néanmoins un problème de spécificité de

détection : on espère en effet mettre en évidence un ralentissement spécifique de la dynamique d'échange au niveau des passages transmembranaires de l'ATPase, et il n'est pas évident que la spectroscopie infrarouge permette de reconnaître les protons amide de ces régions-là. Il faudrait alors se tourner vers des études de localisation plus précise des protons échangés, par exemple par des méthodes d'échange proton/deutérium couplées à de la spectrométrie de masse après traitement avec des protéases stables en milieu acide (Nazabal et al. 2003; Busenlehner and Armstrong 2005).

A ces mouvements, relativement lents (quelques millisecondes), s'ajoutent enfin des mouvements locaux très rapides (micro, voire nanosecondes) qui résultent de la dynamique locale de la molécule. Nous avons évoqué ces mouvements au chapitre V, paragraphe 1.3. Mais nous avons considéré qu'il n'était pas probable qu'ils puissent remettre en cause notre estimation que dans des conditions classiques, les ATPases complexées avec l'ADP/fluororaluminate avaient une *conformation moyenne* différente des ATPases ayant fixé de l'AMPPCP. Une grande partie de notre estimation était basée sur notre observation de niveaux de fluorescence différents de ces deux formes.

On pourrait peut-être nous opposer l'idée que pour la forme E1.AMPPCP, ces mouvements locaux très rapides de la partie transmembranaire font transitoirement entrer les Trp en contact avec le milieu aqueux, ce qui induit une extinction de leur fluorescence, alors que ces mouvements seraient restreints pour E1.ADP.AIF₄, plus rigide, y compris au niveau des segments transmembranaires, d'où extinction moins fréquente de fluorescence par le milieu aqueux. Ce type d'argument expliquerait effectivement pourquoi le niveau de fluorescence de la forme E1.AMPPCP pourrait être plus bas que celui de la forme E1.ADP.AIF_x. Toutefois, nous sommes enclins à croire que la stabilisation par l'ADP/fluoroaluminate des domaines N, P et A de l'ATPase a peu de chances d'influencer beaucoup, à grande distance, les mouvements rapides et de petite amplitude des Trp de la partie transmembranaire. Reconnaissons cependant que cette croyance peut sembler quelque peu arbitraire. Toutefois, les mesures de fluorescence intrinsèques que nous avons réalisées afin de mettre en évidence les différents intermédiaires fluorés obtenus en absence de Ca²⁺ (voir chapitre V, paragraphe 2.1) la confortent. En effet, nous avons montré que la formation du complexe E2.BeF_x s'accompagne d'une *augmentation* de fluorescence, alors que l'ouverture luminale des sites de transport dans cette forme laisse pourtant présager une plus grande dynamique du secteur transmembranaire ; à l'inverse, la formation du complexe E2.AIF₄, forme probablement plus rigide en raison de la fermeture de ses sites luminaux, induit une variation de fluorescence relativement marginale, et vers le bas. Par ailleurs, il semblerait que à l'échelle de quelques nanosecondes (échelle de temps parfaitement appropriée pour regarder les Trp, puisque leur temps de vie est précisément de cet ordre), les Trp de l'ATPase bougent relativement peu, tout au moins d'après les simulations moléculaires (C. Toyoshima, communication personnelle).

Nous avons montré dans cette thèse qu'il était possible d'expliquer en quoi les conditions de cristallisation sont susceptibles d'entraîner des artéfacts mais aussi de donner confiance dans certains résultats structuraux, voire de suggérer la mise en œuvre de nouveaux essais de cristallisation. Prêter davantage attention à la dynamique de la protéine, sans céder à la facilité d'invoquer rituellement les sacro-saints (et bien flous) « changements de conformation » de celle-ci, sera sûrement pour nous un réflexe durable, même si pour l'instant il n'a pas encore débouché sur la mise au point de tests expérimentaux adaptés.

Bibliographie

Bibliographie

- Albers, R.W. 1967. Biochemical Aspects of Active Transport. *Annual Review of Biochemistry* **36**: 727-756.
- Allen, G., and Green, N.M. 1976. A 31-residue tryptic peptide from the active site of the $[Ca^{++}]$ -transporting adenosine triphosphatase of rabbit sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **63**: 188-192.
- Andersen, J.P. 1995. Dissection of the functional domains of the sarcoplasmic reticulum $Ca(2+)$ -ATPase by site-directed mutagenesis. *Biosci Rep* **15**: 243-261.
- Andersen, J.P., Lassen, K., and Møller, J.V. 1985. Changes in Ca^{2+} affinity related to conformational transitions in the phosphorylated state of soluble monomeric Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **260**: 371-380.
- Andersen, J.P., and Vilsen, B. 1994. Amino acids Asn796 and Thr799 of the $Ca(2+)$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum bind Ca^{2+} at different sites. *J Biol Chem* **269**: 15931-15936.
- Aravind, L., Galperin, M.Y., and Koonin, E.V. 1998. The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. *Trends Biochem Sci* **23**: 127-129.
- Arredouani, A., Guiot, Y., Jonas, J.C., Liu, L.H., Nenquin, M., Pertusa, J.A., Rahier, J., Rolland, J.F., Shull, G.E., Stevens, M., et al. 2002. SERCA3 ablation does not impair insulin secretion but suggests distinct roles of different sarcoendoplasmic reticulum $Ca(2+)$ pumps for $Ca(2+)$ homeostasis in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **51**: 3245-3253.
- Auland, M.E., Roufogalis, B.D., Devaux, P.F., and Zachowski, A. 1994. Reconstitution of ATP-dependent aminophospholipid translocation in proteoliposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10938-10942.
- Axelsen, K.B., and Palmgren, M.G. 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* **46**: 84-101.
- Axelsen, K.B., and Palmgren, M.G. 2001. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**: 696-706.
- Barlogie, B., Hasselbach, W., and Makinose, M. 1971. Activation of calcium efflux by ADP and inorganic phosphate. *FEBS Lett* **12**: 267-268.
- Barth, A. 1999. Phosphoenzyme conversion of the sarcoplasmic reticulum $Ca(2+)$ -ATPase. Molecular interpretation of infrared difference spectra. *J Biol Chem* **274**: 22170-22175.
- Bashford, D., and Karplus, M. 1990. pKa's of ionizable groups in proteins: atomic detail from a continuum electrostatic model. *Biochemistry* **29**: 10219-10225.
- Bastide, F., Meissner, G., Fleischer, S., and Post, R.L. 1973. Similarity of the active site of phosphorylation of the adenosine triphosphatase from transport of sodium and potassium ions in kidney to that for transport of calcium ions in the sarcoplasmic reticulum of muscle. *J Biol Chem* **248**: 8385-8391.
- Berman, M.C., and King, S.B. 1990. Stoichiometries of calcium and strontium transport coupled to ATP and acetyl phosphate hydrolysis by skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1029**: 235-240.
- Berneche, S., and Roux, B. 2002. The ionization state and the conformation of Glu-71 in the KcsA $K(+)$ channel. *Biophys J* **82**: 772-780.
- Berridge, M.J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.

- Berridge, M.J. 1995. Capacitative calcium entry. *Biochem J* **312** (Pt 1): 1-11.
- Berridge, M.J. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* **499** (Pt 2): 291-306.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 11-21.
- Brandl, C.J., Green, N.M., Korczak, B., and MacLennan, D.H. 1986. Two Ca²⁺ ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell* **44**: 597-607.
- Brittsan, A.G., and Kranias, E.G. 2000. Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol* **32**: 2131-2139.
- Brody, I.A. 1969. Muscle contracture induced by exercise. A syndrome attributable to decreased relaxing factor. *N Engl J Med* **281**: 187-192.
- Broos, J., Strambini, G.B., Gonnelli, M., Vos, E.P., Koolhof, M., and Robillard, G.T. 2000. Sensitive monitoring of the dynamics of a membrane-bound transport protein by tryptophan phosphorescence spectroscopy. *Biochemistry* **39**: 10877-10883.
- Brouland, J.P., Gelebart, P., Kovacs, T., Enouf, J., Grossmann, J., and Papp, B. 2005. The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *Am J Pathol* **167**: 233-242.
- Burk, S.E., Lytton, J., MacLennan, D.H., and Shull, G.E. 1989. cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca²⁺ pump. *J Biol Chem* **264**: 18561-18568.
- Busenlehner, L.S., and Armstrong, R.N. 2005. Insights into enzyme structure and dynamics elucidated by amide H/D exchange mass spectrometry. *Arch Biochem Biophys* **433**: 34-46.
- Cable, M.B., Feher, J.J., and Briggs, F.N. 1985. Mechanism of allosteric regulation of the Ca,Mg-ATPase of sarcoplasmic reticulum: studies with 5'-adenylyl methylenediphosphate. *Biochemistry* **24**: 5612-5619.
- Calhoun, D.B., Vanderkooi, J.M., Holtom, G.R., and Englander, S.W. 1986. Protein fluorescence quenching by small molecules: protein penetration versus solvent exposure. *Proteins* **1**: 109-115.
- Camakaris, J., Voskoboinik, I., and Mercer, J.F. 1999. Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* **261**: 225-232.
- Carafoli, E. 2002. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1115-1122.
- Carafoli, E. 2004. Calcium-mediated cellular signals: a story of failures. *Trends Biochem Sci* **29**: 371-379.
- Champeil, P. 1996. Kinetic characterization of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. *Biomembranes* **5**: 43-76.
- Champeil, P., Bastide, F., Taupin, C., and Gary-Bobo, C.M. 1976. Spin labelled sarcoplasmic reticulum vesicles: Ca²⁺-induced spectral changes. *FEBS Lett* **63**: 270-272.
- Champeil, P., Buschlen-Boucly, S., Bastide, F., and Gary-Bobo, C. 1978. Sarcoplasmic reticulum ATPase. Spin labeling detection of ligand-induced changes in the relative reactivities of certain sulfhydryl groups. *J Biol Chem* **253**: 1179-1186.
- Champeil, P., Gingold, M.P., Guillain, F., and Inesi, G. 1983. Effect of magnesium on the calcium-dependent transient kinetics of sarcoplasmic reticulum ATPase, studied by stopped flow fluorescence and phosphorylation. *J Biol Chem* **258**: 4453-4458.
- Champeil, P., and Guillain, F. 1986. Rapid filtration study of the phosphorylation-dependent dissociation of calcium from transport sites of purified sarcoplasmic reticulum ATPase and ATP modulation of the catalytic cycle. *Biochemistry* **25**: 7623-7633.

- Champeil, P., Guillain, F., Venien, C., and Gingold, M.P. 1985. Interaction of magnesium and inorganic phosphate with calcium-deprived sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase as reflected by organic solvent induced perturbation. *Biochemistry* **24**: 69-81.
- Champeil, P., Hénao, F., and de Foresta, B. 1997. Dissociation of Ca^{2+} from sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and changes in fluorescence of optically selected Trp residues. Effects of KCl and NaCl and implications for substeps in Ca^{2+} dissociation. *Biochemistry* **36**: 12383-12393.
- Champeil, P., le Maire, M., Andersen, J.P., Guillain, F., Gingold, M., Lund, S., and Møller, J.V. 1986a. Kinetic characterization of the normal and detergent-perturbed reaction cycles of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. Rate-limiting step(s) under different conditions. *J Biol Chem* **261**: 16372-16384.
- Champeil, P., Le Maire, M., Møller, J.V., Riollet, S., Guillain, F., and Green, N.M. 1986b. Does intrinsic fluorescence reflect conformational changes in the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum? *FEBS Lett* **206**: 93-98.
- Champeil, P., Menguy, T., Soulie, S., Juul, B., de Gracia, A.G., Rusconi, F., Falson, P., Denoroy, L., Hénao, F., le Maire, M., et al. 1998. Characterization of a protease-resistant domain of the cytosolic portion of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Nucleotide- and metal-binding sites. *J Biol Chem* **273**: 6619-6631.
- Champeil, P., Menguy, T., Tribet, C., Popot, J.L., and le Maire, M. 2000. Interaction of amphipols with sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem* **275**: 18623-18637.
- Clapham, D.E. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**: 517-524.
- Clarke, D.M., Loo, T.W., Inesi, G., and MacLennan, D.H. 1989. Location of high affinity Ca^{2+} -binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Nature* **339**: 476-478.
- Clarke, D.M., Loo, T.W., and MacLennan, D.H. 1990. Functional consequences of alterations to amino acids located in the nucleotide binding domain of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **265**: 22223-22227.
- Clausen, J.D., Vilsen, B., McIntosh, D.B., Einholm, A.P., and Andersen, J.P. 2004. Glutamate-183 in the conserved TGES motif of domain A of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase assists in catalysis of E2/E2P partial reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2776-2781.
- Corbett, E.F., and Michalak, M. 2000. Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem Sci* **25**: 307-311.
- Corey, D.P. 2003. New TRP channels in hearing and mechanosensation. *Neuron* **39**: 585-588.
- Currie, E.P., Norde, W., and Cohen Stuart, M.A. 2003. Tethered polymer chains: surface chemistry and their impact on colloidal and surface properties. *Adv Colloid Interface Sci* **100-102**: 205-265.
- da Gloria, M., Carvalho, C., de Souza, D.G., and de Meis, L. 1976. On a possible mechanism of energy conservation in sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **251**: 3629-3636.
- Daiho, T., Yamasaki, K., Wang, G., Danko, S., Iizuka, H., and Suzuki, H. 2003. Deletions of any single residues in Glu40-Ser48 loop connecting a domain and the first transmembrane helix of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase result in almost complete inhibition of conformational transition and hydrolysis of phosphoenzyme intermediate. *J Biol Chem*.
- Danko, S., Daiho, T., Yamasaki, K., Kamidochi, M., Suzuki, H., and Toyoshima, C. 2001a. ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -

ATPase has a compact conformation resistant to proteinase K, V8 protease and trypsin. *FEBS Lett* **489**: 277-282.

- Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., and Suzuki, H. 2004. Distinct Natures of Beryllium Fluoride-bound, Aluminum Fluoride-bound, and Magnesium Fluoride-bound Stable Analogues of an ADP-insensitive Phosphoenzyme Intermediate of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase: CHANGES IN CATALYTIC AND TRANSPORT SITES DURING PHOSPHOENZYME HYDROLYSIS. *J Biol Chem* **279**: 14991-14998.
- Danko, S., Yamasaki, K., Daiho, T., Suzuki, H., and Toyoshima, C. 2001b. Organization of cytoplasmic domains of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in E(1)P and E(1)ATP states: a limited proteolysis study. *FEBS Lett* **505**: 129-135.
- Davidson, G.A., and Berman, M.C. 1996. Mechanism of thermal uncoupling of Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum as revealed by thapsigargin stabilization. *Biochim Biophys Acta* **1289**: 187-194.
- de Foresta, B., Champeil, P., and le Maire, M. 1990. Different classes of tryptophan residues involved in the conformational changes characteristic of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase cycle. *Eur J Biochem* **194**: 383-388.
- de Gennes, P.G., and Badoz, J. 1994. *Les objets fragiles*.
- de Meis, L., de Souza Otero, A., Martins, O.B., Alves, E.W., Inesi, G., and Nakamoto, R. 1982. Phosphorylation of sarcoplasmic reticulum ATPase by orthophosphate in the absence of Ca^{2+} gradient. Contribution of water activity to the enthalpy and the entropy changes. *J Biol Chem* **257**: 4993-4998.
- de Meis, L., and Hasselbach, W. 1971. Acetyl phosphate as substrate for Ca^{2+} uptake in skeletal muscle microsomes. Inhibition by alkali ions. *J Biol Chem* **246**: 4759-4763.
- de Meis, L., Martins, O.B., and Alves, E.W. 1980. Role of water, hydrogen ion, and temperature on the synthesis of adenosine triphosphate by the sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase in the absence of a calcium ion gradient. *Biochemistry* **19**: 4252-4261.
- de Meis, L., and Vianna, A.L. 1979. Energy interconversion by the Ca^{2+} -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **48**: 275-292.
- Degani, C., and Boyer, P.D. 1973. A borohydride reduction method for characterization of the acyl phosphate linkage in proteins and its application to sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* **248**: 8222-8226.
- Demaurex, N., and Distelhorst, C. 2003. Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. *Science* **300**: 65-67.
- Dode, L., Vilsen, B., Van Baelen, K., Wuytack, F., Clausen, J.D., and Andersen, J.P. 2002. Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 1 and 3 isoforms by steady-state and transient kinetic analyses. *J Biol Chem* **277**: 45579-45591.
- Dupont, Y. 1976. Fluorescence studies of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Biochem Biophys Res Commun* **71**: 544-550.
- Dupont, Y. 1980. Occlusion of divalent cations in the phosphorylated calcium pump of sarcoplasmic reticulum. *Eur J Biochem* **109**: 231-238.
- Dupont, Y. 1982. Low-temperature studies of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. Mechanisms of calcium binding. *Biochim Biophys Acta* **688**: 75-87.
- Dupont, Y. 1984. A rapid-filtration technique for membrane fragments or immobilized enzymes: measurements of substrate binding or ion fluxes with a few-millisecond time resolution. *Anal Biochem* **142**: 504-510.
- Dupont, Y., Bennett, N., and Lacapère, J.J. 1982. ATP-induced conformational transitions of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Ann N Y Acad Sci* **402**: 569-572.

- Dupont, Y., and Leigh, J.B. 1978. Transient kinetics of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} + Mg^{2+} ATPase studied by fluorescence. *Nature* **273**: 396-398.
- Dupont, Y., and Pougeois, R. 1983. Evaluation of H_2O activity in the free or phosphorylated catalytic site of Ca^{2+} -ATPase. *FEBS Lett* **156**: 93-98.
- Duval-Terrié, C., Cosette, P., Molle, G., Muller, G., and Dé, E. 2003. Amphiphilic biopolymers (amphibiopols) as new surfactants for membrane protein solubilization. *Protein Sci* **12**: 681-689.
- Dux, L., and Martonosi, A. 1983. Two-dimensional arrays of proteins in sarcoplasmic reticulum and purified Ca^{2+} -ATPase vesicles treated with vanadate. *J Biol Chem* **258**: 2599-2603.
- Ebashi, S., and Lipmann, F. 1962. ADENOSINE TRIPHOSPHATE-LINKED CONCENTRATION OF CALCIUM IONS IN A PARTICULATE FRACTION OF RABBIT MUSCLE. *J. Cell Biol.* **14**: 389-400.
- Eckstein-Ludwig, U., Webb, R.J., Van Goethem, I.D., East, J.M., Lee, A.G., Kimura, M., O'Neill, P.M., Bray, P.G., Ward, S.A., and Krishna, S. 2003. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **424**: 957-961.
- Eftink, M.R., and Ghiron, C.A. 1975. Dynamics of a protein matrix revealed by fluorescence quenching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 3290-3294.
- Eletr, S., and Inesi, G. 1972. Phospholipid orientation in sarcoplasmic membranes: spin-label ESR and proton MNR studies. *Biochim Biophys Acta* **282**: 174-179.
- Falson, P., Menguy, T., Corre, F., Bouneau, L., de Gracia, A.G., Soulie, S., Centeno, F., Møller, J.V., Champeil, P., and le Maire, M. 1997. The cytoplasmic loop between putative transmembrane segments 6 and 7 in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase binds Ca^{2+} and is functionally important. *J Biol Chem* **272**: 17258-17262.
- Fersht, A. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science*, New York.
- Forbush, B., 3rd. 1987a. Rapid release of 42K and 86Rb from an occluded state of the Na,K-pump in the presence of ATP or ADP. *J Biol Chem* **262**: 11104-11115.
- Forbush, B., 3rd. 1987b. Rapid release of 42K or 86Rb from two distinct transport sites on the Na,K-pump in the presence of Pi or vanadate. *J Biol Chem* **262**: 11116-11127.
- Forge, V., Mintz, E., Canet, D., and Guillain, F. 1995. Luminal Ca^{2+} dissociation from the phosphorylated Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum is sequential. *J Biol Chem* **270**: 18271-18276.
- Forge, V., Mintz, E., and Guillain, F. 1993a. Ca^{2+} binding to sarcoplasmic reticulum ATPase revisited. I. Mechanism of affinity and cooperativity modulation by H^{+} and Mg^{2+} . *J Biol Chem* **268**: 10953-10960.
- Forge, V., Mintz, E., and Guillain, F. 1993b. Ca^{2+} binding to sarcoplasmic reticulum ATPase revisited. II. Equilibrium and kinetic evidence for a two-route mechanism. *J Biol Chem* **268**: 10961-10968.
- Fujimori, T., and Jencks, W.P. 1990. Lanthanum inhibits steady-state turnover of the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase by replacing magnesium as the catalytic ion. *J Biol Chem* **265**: 16262-16270.
- Gelebart, P., Kovacs, T., Brouland, J.P., van Gorp, R., Grossmann, J., Rivard, N., Panis, Y., Martin, V., Bredoux, R., Enouf, J., et al. 2002. Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation. *J Biol Chem* **277**: 26310-26320.
- Ghazi, A., Berrier, C., Ajouz, B., and Besnard, M. 1998. Mechanosensitive ion channels and their mode of activation. *Biochimie* **80**: 357-362.
- Glynn, I.M. 1993. Annual review prize lecture. 'All hands to the sodium pump'. *J Physiol* **462**: 1-30.

- Glynn, I.M., Howland, J.L., and Richards, D.E. 1985. Evidence for the ordered release of rubidium ions occluded within the Na,K-ATPase of mammalian kidney. *J Physiol* **368**: 453-469.
- Gohon, Y., Pavlov, G., Timmins, P., Tribet, C., Popot, J.L., and Ebel, C. 2004. Partial specific volume and solvent interactions of amphipol A8-35. *Anal Biochem* **334**: 318-334.
- Gomes, E., Jakobsen, M.K., Axelsen, K.B., Geisler, M., and Palmgren, M.G. 2000. Chilling tolerance in Arabidopsis involves ALA1, a member of a new family of putative aminophospholipid translocases. *Plant Cell* **12**: 2441-2454.
- Gorzelle, B.M., Hoffman, A.K., Keyes, M.H., Gray, D.N., Ray, D.G., and Sanders, C.R. 2002. Amphipols can support the activity of a membrane enzyme. *J Am Chem Soc* **124**: 11594-11595.
- Green, N.M., and Stokes, D.L. 1992. Structural modelling of P-type ion pumps. *Acta Physiol Scand Suppl* **607**: 59-68.
- Guerini, D., Coletto, L., and Carafoli, E. 2005. Exporting calcium from cells. *Cell Calcium* **38**: 281-289.
- Guillain, F., Gingold, M.P., Buschlen, S., and Champeil, P. 1980. A direct fluorescence study of the transient steps induced by calcium binding to sarcoplasmic reticulum ATPase. *J Biol Chem* **255**: 2072-2076.
- Guillain, F., Gingold, M.P., and Champeil, P. 1982. Direct fluorescence measurements of Mg²⁺ binding to sarcoplasmic reticulum ATPase. *J Biol Chem* **257**: 7366-7371.
- Gutfreund, H., and Knowles, J.R. 1967. The foundations of enzyme action. *Essays Biochem* **3**: 25-72.
- Hanel, A.M., and Jencks, W.P. 1991. Dissociation of calcium from the phosphorylated calcium-transporting adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum: kinetic equivalence of the calcium ions bound to the phosphorylated enzyme. *Biochemistry* **30**: 11320-11330.
- Hasselbach, W., and Makinose, M. 1961. [The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting.]. *Biochem Z* **333**: 518-528.
- Hasselbach, W., and Makinose, M. 1963. [on the Mechanism of Calcium Transport across the Membrane of the Sarcoplasmic Reticulum.]. *Biochem Z* **339**: 94-111.
- Henderson, I.M., Khan, Y.M., East, J.M., and Lee, A.G. 1994a. Binding of Ca²⁺ to the (Ca(2+)-Mg(2+))-ATPase of sarcoplasmic reticulum: equilibrium studies. *Biochem J* **297 (Pt 3)**: 615-624.
- Henderson, I.M., Starling, A.P., Wictome, M., East, J.M., and Lee, A.G. 1994b. Binding of Ca²⁺ to the (Ca(2+)-Mg(2+))-ATPase of sarcoplasmic reticulum: kinetic studies. *Biochem J* **297 (Pt 3)**: 625-636.
- Hilge, M., Siegal, G., Vuister, G.W., Guntert, P., Gloor, S.M., and Abrahams, J.P. 2003. ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na,K-ATPase. *Nat Struct Biol* **10**: 468-474.
- Hisano, T., Hata, Y., Fujii, T., Liu, J.Q., Kurihara, T., Esaki, N., and Soda, K. 1996. Crystal structure of L-2-haloacid dehalogenase from Pseudomonas sp. YL. An alpha/beta hydrolase structure that is different from the alpha/beta hydrolase fold. *J Biol Chem* **271**: 20322-20330.
- Hu, Z., Bonifas, J.M., Beech, J., Bench, G., Shigihara, T., Ogawa, H., Ikeda, S., Mauro, T., and Epstein, E.H., Jr. 2000. Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat Genet* **24**: 61-65.
- Hua, S., Xu, C., Ma, H., and Inesi, G. 2005. Interference with phosphoenzyme isomerization and inhibition of the sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase by 1,3-dibromo-2,4,6-tris(methylisothiuronium) benzene. *J Biol Chem* **280**: 17579-17583.

- Humphrey, P.A., Lupfert, C., Apell, H.J., Cornelius, F., and Clarke, R.J. 2002. Mechanism of the rate-determining step of the Na(+),K(+)-ATPase pump cycle. *Biochemistry* **41**: 9496-9507.
- Ikemoto, N., Garcia, A.M., Kurobe, Y., and Scott, T.L. 1981. Nonequivalent subunits in the calcium pump of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **256**: 8593-8601.
- Inesi, G. 1987. Sequential mechanism of calcium binding and translocation in sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* **262**: 16338-16342.
- Inesi, G., Kurzmack, M., Coan, C., and Lewis, D.E. 1980. Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem* **255**: 3025-3031.
- Inesi, G., Ma, H., Lewis, D., and Xu, C. 2004. Ca²⁺ occlusion and gating function of Glu309 in the ADP-fluoroaluminate analog of the Ca²⁺-ATPase phosphoenzyme intermediate. *J Biol Chem* **279**: 31629-31637.
- Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Hara, Y., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y., and Mori, Y. 2001. The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca(2+)-permeable cation channel. *Circ Res* **88**: 325-332.
- Jencks, W.P. 1989. How does a calcium pump pump calcium? *J Biol Chem* **264**: 18855-18858.
- Jencks, W.P. 1997. From chemistry to biochemistry to catalysis to movement. *Annu Rev Biochem* **66**: 1-18.
- Jencks, W.P., Yang, T., Peisach, D., and Myung, J. 1993. Calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum has four binding sites for calcium. *Biochemistry* **32**: 7030-7034.
- Ji, Y., Lalli, M.J., Babu, G.J., Xu, Y., Kirkpatrick, D.L., Liu, L.H., Chiamvimonvat, N., Walsh, R.A., Shull, G.E., and Periasamy, M. 2000. Disruption of a single copy of the SERCA2 gene results in altered Ca²⁺ homeostasis and cardiomyocyte function. *J Biol Chem* **275**: 38073-38080.
- Jidenko, M., Nielsen, R.C., Sorensen, T.L., Moller, J.V., le Maire, M., Nissen, P., and Jaxel, C. 2005. Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11687-11691.
- John, L.M., Lechleiter, J.D., and Camacho, P. 1998. Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J Cell Biol* **142**: 963-973.
- Jonas, J.C., Sharma, A., Hasenkamp, W., Ilkova, H., Patane, G., Laybutt, R., Bonner-Weir, S., and Weir, G.C. 1999. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* **274**: 14112-14121.
- Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O., and Karlsh, S.J. 2003. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol* **65**: 817-849.
- Juul, B., Turc, H., Durand, M.L., Gomez de Gracia, A., Denoroy, L., Møller, J.V., Champeil, P., and le Maire, M. 1995. Do transmembrane segments in proteolyzed sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase retain their functional Ca²⁺ binding properties after removal of cytoplasmic fragments by proteinase K? *J Biol Chem* **270**: 20123-20134.
- Kanazawa, T., and Boyer, P.D. 1973. Occurrence and characteristics of a rapid exchange of phosphate oxygens catalyzed by sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem* **248**: 3163-3172.
- Kato, S., Kamidochi, M., Daiho, T., Yamasaki, K., Gouli, W., and Suzuki, H. 2003. Val200 residue in Lys189-Lys205 outermost loop on the A domain of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase is critical for rapid processing of phosphoenzyme intermediate after loss of ADP sensitivity. *J Biol Chem* **278**: 9624-9629.
- Khan, Y.M., Wictome, M., East, J.M., and Lee, A.G. 1995. Interactions of dihydroxybenzenes with the Ca(2+)-ATPase: separate binding sites for dihydroxybenzenes and sesquiterpene lactones. *Biochemistry* **34**: 14385-14393.

- Kijima, Y., Ogunbunmi, E., and Fleischer, S. 1991. Drug action of thapsigargin on the Ca^{2+} pump protein of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **266**: 22912-22918.
- Kim, H.Y., Heo, Y.S., Kim, J.H., Park, M.H., Moon, J., Kim, E., Kwon, D., Yoon, J., Shin, D., Jeong, E.J., et al. 2002. Molecular basis for the local conformational rearrangement of human phosphoserine phosphatase. *J Biol Chem* **277**: 46651-46658.
- Kirby, M.S., Sagara, Y., Gaa, S., Inesi, G., Lederer, W.J., and Rogers, T.B. 1992. Thapsigargin inhibits contraction and Ca^{2+} transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump. *J Biol Chem* **267**: 12545-12551.
- Kiriazis, H., and Kranias, E.G. 2000. Genetically engineered models with alterations in cardiac membrane calcium-handling proteins. *Annu Rev Physiol* **62**: 321-351.
- Knowles, J. 2003. Chemistry. Seeing is believing. *Science* **299**: 2002-2003.
- Kretsinger, R.H. 1972. Gene triplication deduced from the tertiary structure of a muscle calcium binding protein. *Nat New Biol* **240**: 85-88.
- Kühlbrandt, W. 2004. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 282-295.
- Kühlbrandt, W., Zeelen, J., and Dietrich, J. 2002. Structure, mechanism, and regulation of the *Neurospora* plasma membrane H^{+} -ATPase. *Science* **297**: 1692-1696.
- Lacapère, J.J., Bennett, N., Dupont, Y., and Guillain, F. 1990. pH and magnesium dependence of ATP binding to sarcoplasmic reticulum ATPase. Evidence that the catalytic ATP-binding site consists of two domains. *J Biol Chem* **265**: 348-353.
- Lacapère, J.J., Gingold, M.P., Champeil, P., and Guillain, F. 1981. Sarcoplasmic reticulum ATPase phosphorylation from inorganic phosphate in the absence of a calcium gradient. Steady state and kinetic fluorescence studies. *J Biol Chem* **256**: 2302-2306.
- Lacapère, J.J., and Guillain, F. 1993. The reaction mechanism of Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. Direct measurement of the $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ dissociation constant gives similar values in the presence or absence of calcium. *Eur J Biochem* **211**: 117-126.
- Ladavière, C., Toustou, M., Gulik-Krzywicki, T., and Tribet, C. 2001. Slow Reorganization of Small Phosphatidylcholine Vesicles upon Adsorption of Amphiphilic Polymers. *J Colloid Interface Sci* **241**: 178-187.
- Ladavière, C., Tribet, C., and Cribier, S. 2002. Lateral organization of lipid membranes induced by amphiphilic polymer inclusions. *Langmuir* **18**: 7320-7327.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lahiri, S.D., Zhang, G., Dunaway-Mariano, D., and Allen, K.N. 2003. The pentacovalent phosphorus intermediate of a phosphoryl transfer reaction. *Science* **299**: 2067-2071.
- le Maire, M., Champeil, P., and Møller, J.V. 2000. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta* **1508**: 86-111.
- Lee, A.G., and East, J.M. 2001. What the structure of a calcium pump tells us about its mechanism. *Biochem J* **356**: 665-683.
- Legrand, G., Humez, S., Slomianny, C., Dewailly, E., Vanden Abeele, F., Mariot, P., Wuytack, F., and Prevarskaya, N. 2001. Ca^{2+} pools and cell growth. Evidence for sarcoendoplasmic Ca^{2+} -ATPases 2B involvement in human prostate cancer cell growth control. *J Biol Chem* **276**: 47608-47614.
- Lenoir, G., and Holthuis, J.C. 2004. The elusive flippases. *Curr Biol* **14**: R912-913.
- Lenoir, G., Picard, M., Gauron, C., Montigny, C., Le Marechal, P., Falson, P., Le Maire, M., Møller, J.V., and Champeil, P. 2004a. Functional Properties of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase after Proteolytic Cleavage at Leu119-Lys120, Close to the A-domain. *J Biol Chem* **279**: 9156-9166.

- Lenoir, G., Picard, M., Møller, J.V., Le Maire, M., Champeil, P., and Falson, P. 2004b. Involvement of the L6-7 Loop in SERCA1a Ca^{2+} -ATPase Activation by Ca^{2+} (or Sr^{2+}) and ATP. *J Biol Chem* **279**: 32125-32133.
- Li, S.W., Westwick, J., and Poll, C.T. 2002. Receptor-operated Ca^{2+} influx channels in leukocytes: a therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci* **23**: 63-70.
- Logan-Smith, M.J., East, J.M., and Lee, A.G. 2002. Evidence for a global inhibitor-induced conformation change on the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum from paired inhibitor studies. *Biochemistry* **41**: 2869-2875.
- Lund, S., Orlowski, S., de Foresta, B., Champeil, P., le Maire, M., and Moller, J.V. 1989. Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **264**: 4907-4915.
- Lupfert, C., Grell, E., Pintschovius, V., Apell, H.J., Cornelius, F., and Clarke, R.J. 2001. Rate limitation of the Na^{+} , K^{+} -ATPase pump cycle. *Biophys J* **81**: 2069-2081.
- Lutsenko, S., and Kaplan, J.H. 1995. Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry* **34**: 15607-15613.
- Lytton, J., Westlin, M., Burk, S.E., Shull, G.E., and MacLennan, D.H. 1992. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* **267**: 14483-14489.
- Ma, H., Inesi, G., and Toyoshima, C. 2003. Substrate-induced conformational fit and headpiece closure in the Ca^{2+} -ATPase (SERCA). *J Biol Chem* **278**: 28938-28943.
- MacLennan, D.H. 2000. Ca^{2+} signalling and muscle disease. *Eur J Biochem* **267**: 5291-5297.
- MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczak, B., and Green, N.M. 1985. Amino-acid sequence of a Ca^{2+} + Mg^{2+} -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* **316**: 696-700.
- MacLennan, D.H., and Kranias, E.G. 2003. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 566-577.
- MacLennan, D.H., Rice, W.J., and Green, N.M. 1997. The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *J Biol Chem* **272**: 28815-28818.
- Makinose, M. 1971. Calcium efflux dependent formation of ATP from ADP and orthophosphate by the membranes of the sarcoplasmic vesicles. *FEBS Lett* **12**: 269-270.
- Makinose, M. 1972. Phosphoprotein formation during osmo-chemical energy conversion in the membrane of the sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **25**: 113-115.
- Makinose, M. 1973. Possible functional states of the enzyme of the sarcoplasmic calcium pump. *FEBS Lett* **37**: 140-143.
- Makinose, M., and Hasselbach, W. 1971. ATP synthesis by the reverse of the sarcoplasmic calcium pump. *FEBS Lett* **12**: 271-272.
- Martin, V., Bredoux, R., Corvazier, E., Van Gorp, R., Kovacs, T., Gelebart, P., and Enouf, J. 2002. Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family. *J Biol Chem* **277**: 24442-24452.
- Martinez, K.L., Gohon, Y., Corringer, P.J., Tribet, C., Merola, F., Changeux, J.P., and Popot, J.L. 2002. Allosteric transitions of Torpedo acetylcholine receptor in lipids, detergent and amphipols: molecular interactions vs. physical constraints. *FEBS Lett* **528**: 251-256.
- Martonosi, A.N., and Pikula, S. 2003. The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim Pol* **50**: 1-30.
- Maruyama, K., Clarke, D.M., Fujii, J., Inesi, G., Loo, T.W., and MacLennan, D.H. 1989. Functional consequences of alterations to amino acids located in the catalytic center

- (isoleucine 348 to threonine 357) and nucleotide-binding domain of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **264**: 13038-13042.
- Masuda, H., and de Meis, L. 1973. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum membrane by orthophosphate. Inhibition by calcium ions. *Biochemistry* **12**: 4581-4585.
- McIntosh, D.B. 1992. Glutaraldehyde cross-links Lys-492 and Arg-678 at the active site of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem* **267**: 22328-22335.
- McIntosh, D.B. 1998. The ATP binding sites of P-type transport ATPases: properties, structure, conformations, and mechanisms of energy coupling. *Adv. Mol. Cell. Biol.* **23A**: 33-99.
- McIntosh, D.B., Ross, D.C., Champeil, P., and Guillain, F. 1991. Crosslinking the active site of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase completely blocks Ca^{2+} release to the vesicle lumen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6437-6441.
- McIntosh, D.B., Woolley, D.G., MacLennan, D.H., Vilsen, B., and Andersen, J.P. 1999. Interaction of nucleotides with Asp(351) and the conserved phosphorylation loop of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem* **274**: 25227-25236.
- McIntosh, D.B., Woolley, D.G., Vilsen, B., and Andersen, J.P. 1996. Mutagenesis of segment 487Phe-Ser-Arg-Asp-Arg-Lys492 of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase produces pumps defective in ATP binding. *J Biol Chem* **271**: 25778-25789.
- Meissner, G. 1973. ATP and Ca^{2+} binding by the Ca^{2+} pump protein of sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **298**: 906-926.
- Meldolesi, J., and Pozzan, T. 1998. The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci* **23**: 10-14.
- Menguy, T., Corre, F., Bouneau, L., Deschamps, S., Møller, J.V., Champeil, P., le Maire, M., and Falson, P. 1998. The cytoplasmic loop located between transmembrane segments 6 and 7 controls activation by Ca^{2+} of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem* **273**: 20134-20143.
- Menguy, T., Corre, F., Juul, B., Bouneau, L., Lafitte, D., Derrick, P.J., Sharma, P.S., Falson, P., Levine, B.A., Møller, J.V., et al. 2002. Involvement of the cytoplasmic loop L6-7 in the entry mechanism for transport of Ca^{2+} through the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem* **277**: 13016-13028.
- Meszaros, L.G., and Bak, J.Z. 1993. Coexistence of high- and low-affinity Ca^{2+} binding sites of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Biochemistry* **32**: 10085-10088.
- Mills, R.F., Krijger, G.C., Baccarini, P.J., Hall, J.L., and Williams, L.E. 2003. Functional expression of AtHMA4, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. *Plant J* **35**: 164-176.
- Mintz, E., Forge, V., and Guillain, F. 1993. Dimethyl sulfoxide favours the covalent phosphorylation and not the binding of P_i to sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochim Biophys Acta* **1162**: 227-229.
- Mintz, E., Lacapère, J.J., and Guillain, F. 1990. Reversal of the sarcoplasmic reticulum ATPase cycle by substituting various cations for magnesium. Phosphorylation and ATP synthesis when Ca^{2+} replaces Mg^{2+} . *J Biol Chem* **265**: 18762-18768.
- Mintz, E., Mata, A.M., Forge, V., Passafiume, M., and Guillain, F. 1995. The modulation of Ca^{2+} binding to sarcoplasmic reticulum ATPase by ATP analogues is pH-dependent. *J Biol Chem* **270**: 27160-27164.
- Mitchinson, C., Wilderspin, A.F., Trinnaman, B.J., and Green, N.M. 1982. Identification of a labelled peptide after stoichiometric reaction of fluorescein isothiocyanate with the Ca^{2+} -dependent adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **146**: 87-92.
- Møller, J.V., Juul, B., and le Maire, M. 1996. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* **1286**: 1-51.

- Møller, J.V., Lenoir, G., Marchand, C., Montigny, C., le Maire, M., Toyoshima, C., Juul, B.S., and Champeil, P. 2002. Calcium transport by sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. Role of the A domain and its C-terminal link with the transmembrane region. *J Biol Chem* **277**: 38647-38659.
- Møller, J.V., Lind, K.E., and Andersen, J.P. 1980. Enzyme kinetics and substrate stabilization of detergent-solubilized and membraneous (Ca²⁺ + Mg²⁺)-activated ATPase from sarcoplasmic reticulum. Effect of protein-protein interactions. *J Biol Chem* **255**: 1912-1920.
- Møller, J.V., Nissen, P., Sørensen, T.L., and Maire, M. 2005. Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase pump. *Curr Opin Struct Biol* **15**: 387-393.
- Montigny, C., Jaxel, C., Shainskaya, A., Vinh, J., Labas, V., Møller, J.V., Karlisch, S.J., and le Maire, M. 2004. Fe²⁺-catalyzed oxidative cleavages of Ca²⁺-ATPase reveal novel features of its pumping mechanism. *J Biol Chem* **279**: 43971-43981.
- Mueller, B., Zhao, M., Negrashov, I.V., Bennett, R., and Thomas, D.D. 2004. SERCA structural dynamics induced by ATP and calcium. *Biochemistry* **43**: 12846-12854.
- Myung, J., and Jencks, W.P. 1994. Lumenal and cytoplasmic binding sites for calcium on the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum are different and independent. *Biochemistry* **33**: 8775-8785.
- Nazabal, A., Laguerre, M., Schmitter, J.M., Vaillier, J., Chaignepain, S., and Velours, J. 2003. Hydrogen/deuterium exchange on yeast ATPase supramolecular protein complex analyzed at high sensitivity by MALDI mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **14**: 471-481.
- Nowycky, M.C., and Thomas, A.P. 2002. Intracellular calcium signaling. *J Cell Sci* **115**: 3715-3716.
- Obara, K., Miyashita, N., Xu, C., Toyoshima, I., Sugita, Y., Inesi, G., and Toyoshima, C. 2005. Structural role of countertransport revealed in Ca²⁺ pump crystal structure in the absence of Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Odermatt, A., Barton, K., Khanna, V.K., Mathieu, J., Escolar, D., Kuntzer, T., Karpati, G., and MacLennan, D.H. 2000. The mutation of Pro789 to Leu reduces the activity of the fast-twitch skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA1) and is associated with Brody disease. *Hum Genet* **106**: 482-491.
- Odermatt, A., Becker, S., Khanna, V.K., Kurzydowski, K., Leisner, E., Pette, D., and MacLennan, D.H. 1998. Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* **273**: 12360-12369.
- Odermatt, A., Taschner, P.E., Scherer, S.W., Beatty, B., Khanna, V.K., Cornblath, D.R., Chaudhry, V., Yee, W.C., Schrank, B., Karpati, G., et al. 1997. Characterization of the gene encoding human sarcolipin (SLN), a proteolipid associated with SERCA1: absence of structural mutations in five patients with Brody disease. *Genomics* **45**: 541-553.
- Ogawa, H., Stokes, D.L., Sasabe, H., and Toyoshima, C. 1998. Structure of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum: a view along the lipid bilayer at 9-Å resolution. *Biophys J* **75**: 41-52.
- Ogurusu, T., Wakabayashi, S., and Shigekawa, M. 1991. Activation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase by Mn²⁺: a Mn²⁺ binding study. *J Biochem (Tokyo)* **109**: 472-476.
- Olesen, C., Sørensen, T.L., Nielsen, R.C., Møller, J.V., and Nissen, P. 2004. Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion. *Science* **306**: 2251-2255.

- Orlowski, S., and Champeil, P. 1991a. Kinetics of calcium dissociation from its high-affinity transport sites on sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochemistry* **30**: 352-361.
- Orlowski, S., and Champeil, P. 1991b. The two calcium ions initially bound to nonphosphorylated sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase can no longer be kinetically distinguished when they dissociate from phosphorylated ATPase toward the lumen. *Biochemistry* **30**: 11331-11342.
- Orlowski, S., and Champeil, P. 1993. Strontium binding to sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. Spectroscopic differentiation of the substeps involved. *FEBS Lett* **328**: 296-300.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 552-565.
- Oxenoid, K., and Chou, J.J. 2005. The structure of phospholamban pentamers reveals a channel like architecture in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10870-10875 (Epub).
- Palmgren, M.G., and Axelsen, K.B. 1998. Evolution of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* **1365**: 37-45.
- Patchornik, G., Goldshleger, R., and Karlsh, S.J. 2000. The complex ATP-Fe(2+) serves as a specific affinity cleavage reagent in ATP-Mg(2+) sites of Na,K-ATPase: altered ligation of Fe(2+) (Mg(2+)) ions accompanies the E(1)→E(2) conformational change. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11954-11959.
- Patchornik, G., Munson, K., Goldshleger, R., Shainskaya, A., Sachs, G., and Karlsh, S.J. 2002. The ATP-Mg²⁺ binding site and cytoplasmic domain interactions of Na⁺,K⁺-ATPase investigated with Fe²⁺-catalyzed oxidative cleavage and molecular modeling. *Biochemistry* **41**: 11740-11749.
- Perez, C., and Boutry, M. 1994. The multigene family of the H(+)-ATPase of plant plasma membranes. *Symp Soc Exp Biol* **48**: 11-22.
- Periasamy, M., Reed, T.D., Liu, L.H., Ji, Y., Loukianov, E., Paul, R.J., Nieman, M.L., Riddle, T., Duffy, J.J., Doetschman, T., et al. 1999. Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. *J Biol Chem* **274**: 2556-2562.
- Petersen, O.H., Michalak, M., and Verkhatsky, A. 2005. Calcium signalling: Past, present and future. *Cell Calcium*.
- Petithory, J.R., and Jencks, W.P. 1986. Phosphorylation of the calcium adenosinetriphosphatase of sarcoplasmic reticulum: rate-limiting conformational change followed by rapid phosphoryl transfer. *Biochemistry* **25**: 4493-4497.
- Petithory, J.R., and Jencks, W.P. 1988. Sequential dissociation of Ca²⁺ from the calcium adenosinetriphosphatase of sarcoplasmic reticulum and the calcium requirement for its phosphorylation by ATP. *Biochemistry* **27**: 5553-5564.
- Picard, M., Dahmane, T., Garrigos, M., Gauron, C., Giusti, F., le Maire, M., Popot, J.L., and Champeil, P. 2005a. Protective and inhibitory effects of various types of amphipols on Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum: a comparative study. *Biochemistry (accepté)*.
- Picard, M., Duval-Terrie, C., De, E., and Champeil, P. 2004a. Stabilization of membranes upon interaction of amphipathic polymers with membrane proteins. *Protein Sci.*
- Picard, M., Duval-Terrié, C., De, E., and Champeil, P. 2004b. Stabilization of membranes upon interaction of amphipathic polymers with membrane proteins. *Protein Sci.*
- Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. 2005b. The average conformation at micromolar [Ca²⁺] of Ca²⁺-ATPase with bound nucleotide differs from that adopted with the transition state analog ADP.AIFx or with AMPPCP under crystallization conditions at millimolar [Ca²⁺]. *J Biol Chem*.

- Picard, M., Toyoshima, C., and Champeil, P. 2005c. Effects of inhibitors on luminal opening of Ca^{2+} binding sites in an E2P-like complex of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase with Be^{2+} -fluoride. *J Biol Chem* (accepted).
- Pick, U., and Karlsh, S.J. 1980. Indications for an oligomeric structure and for conformational changes in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase labelled selectively with fluorescein. *Biochim Biophys Acta* **626**: 255-261.
- Pick, U., and Karlsh, S.J. 1982. Regulation of the conformation transition in the Ca-ATPase from sarcoplasmic reticulum by pH, temperature, and calcium ions. *J Biol Chem* **257**: 6120-6126.
- Pickart, C.M., and Jencks, W.P. 1984. Energetics of the calcium-transporting ATPase. *J Biol Chem* **259**: 1629-1643.
- Post, R.L., Hegyvary, C., and Kume, S. 1972. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* **247**: 6530-6540.
- Post, R.L., and Kume, S. 1973. Evidence for an aspartyl phosphate residue at the active site of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* **248**: 6993-7000.
- Prasad, V., Boivin, G.P., Miller, M.L., Liu, L.H., Erwin, C.R., Warner, B.W., and Shull, G.E. 2005. Haploinsufficiency of Atp2a2, encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoform 2 Ca^{2+} pump, predisposes mice to squamous cell tumors via a novel mode of cancer susceptibility. *Cancer Res* **65**: 8655-8661.
- Punzengruber, C., Prager, R., Kolassa, N., Winkler, F., and Suko, J. 1978. Calcium gradient-dependent and calcium gradient-independent phosphorylation of sarcoplasmic reticulum by orthophosphate. The role of magnesium. *Eur J Biochem* **92**: 349-359.
- Radresa, O., Ogata, K., Wodak, S., Ruysschaert, J.M., and Goormaghtigh, E. 2002. Modeling the three-dimensional structure of H^{+} -ATPase of *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem* **269**: 5246-5258.
- Rao, R., Nakamoto, R.K., Verjovski-Almeida, S., and Slayman, C.W. 1992. Structure and function of the yeast plasma-membrane H^{+} -ATPase. *Ann N Y Acad Sci* **671**: 195-203.
- Rauch, B., von Chak, D., and Hasselbach, W. 1978. An estimate of the kinetics of calcium binding and dissociation of the sarcoplasmic reticulum transport ATPase. *FEBS Lett* **93**: 65-68.
- Reinstein, J., and Jencks, W.P. 1993. The binding of ATP and Mg^{2+} to the calcium adenosinetriphosphatase of sarcoplasmic reticulum follows a random mechanism. *Biochemistry* **32**: 6632-6642.
- Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., and Rosen, B.P. 2000. CopA: An Escherichia coli Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 652-656.
- Rensing, C., Sun, Y., Mitra, B., and Rosen, B.P. 1998. Pb(II)-translocating P-type ATPases. *J Biol Chem* **273**: 32614-32617.
- Ridley, R.G. 2003. Malaria: to kill a parasite. *Nature* **424**: 887-889.
- Rizzuto, R., Bernardi, P., and Pozzan, T. 2000. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol* **529 Pt 1**: 37-47.
- Ross, D.C., and McIntosh, D.B. 1987a. Intramolecular cross-linking at the active site of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. High and low affinity nucleotide binding and evidence of active site closure in E2-P. *J Biol Chem* **262**: 12977-12983.
- Ross, D.C., and McIntosh, D.B. 1987b. Intramolecular cross-linking of domains at the active site links A1 and B subfragments of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **262**: 2042-2049.

- Sagara, Y., Wade, J.B., and Inesi, G. 1992. A conformational mechanism for formation of a dead-end complex by the sarcoplasmic reticulum ATPase with thapsigargin. *J Biol Chem* **267**: 1286-1292.
- Santella, L., and Carafoli, E. 1997. Calcium signaling in the cell nucleus. *Faseb J* **11**: 1091-1109.
- Sarkadi, B., Enyedi, A., Foldes-Papp, Z., and Gardos, G. 1986. Molecular characterization of the in situ red cell membrane calcium pump by limited proteolysis. *J Biol Chem* **261**: 9552-9557.
- Sarkadi, B., Enyedi, A., Penniston, J.T., Verma, A.K., Dux, L., Molnar, E., and Gardos, G. 1988. Characterization of membrane calcium pumps by simultaneous immunoblotting and ³²P radiography. *Biochim Biophys Acta* **939**: 40-46.
- Scales, D.J., and Inesi, G. 1976. Localization of ATPase protein in sarcoplasmic reticulum membrane. *Arch Biochem Biophys* **176**: 392-394.
- Scarborough, G.A. 2003a. Rethinking the P-type ATPase problem. *Trends Biochem Sci* **28**: 581-584.
- Scarborough, G.A. 2003b. Why we must move on from the E1E2 model for the reaction cycle of the P-type ATPases. *J Bioenerg Biomembr* **35**: 193-201.
- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., and Simons, K. 2003. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5795-5800.
- Scofano, H.M., Vieyra, A., and de Meis, L. 1979. Substrate regulation of the sarcoplasmic reticulum ATPase. Transient kinetic studies. *J Biol Chem* **254**: 10227-10231.
- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* **300**: 135-139.
- Seekoe, T., Peall, S., and McIntosh, D.B. 2001. Thapsigargin and dimethyl sulfoxide activate medium P(i) ↔ HOH oxygen exchange catalyzed by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* **276**: 46737-46744.
- Seigneuret, M., and Devaux, P.F. 1984. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 3751-3755.
- Serpensu, E.H., Kirch, U., and Schoner, W. 1982. Demonstration of a stable occluded form of Ca²⁺ by the use of the chromium complex of ATP in the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Eur J Biochem* **122**: 347-354.
- Shigekawa, M., and Dougherty, J.P. 1978a. Reaction mechanism of Ca²⁺-dependent ATP hydrolysis by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in the absence of added alkali metal salts. II. Kinetic properties of the phosphoenzyme formed at the steady state in high Mg²⁺ and low Ca²⁺ concentrations. *J Biol Chem* **253**: 1451-1457.
- Shigekawa, M., and Dougherty, J.P. 1978b. Reaction mechanism of Ca²⁺-dependent ATP hydrolysis by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in the absence of added alkali metal salts. III. Sequential occurrence of ADP-sensitive and ADP-insensitive phosphoenzymes. *J Biol Chem* **253**: 1458-1464.
- Shigekawa, M., Dougherty, J.P., and Katz, A.M. 1978. Reaction mechanism of Ca²⁺-dependent ATP hydrolysis by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in the absence of added alkali metal salts. I. Characterization of steady state ATP hydrolysis and comparison with that in the presence of KCl. *J Biol Chem* **253**: 1442-1450.
- Shigekawa, M., Wakabayashi, S., and Nakamura, H. 1983. Reaction mechanism of Ca²⁺-dependent adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum. ATP hydrolysis with CaATP as a substrate and role of divalent cation. *J Biol Chem* **258**: 8698-8707.

- Sørensen, T.L., Clausen, J.D., Jensen, A.M., Vilsen, B., Møller, J.V., Andersen, J.P., and Nissen, P. 2004a. Localization of a K⁺-binding site involved in dephosphorylation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (e-pub). *J Biol Chem*.
- Sørensen, T.L., Møller, J.V., and Nissen, P. 2004b. Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* **304**: 1672-1675.
- Soulié, S., Denoroy, L., Le Caer, J.P., Hamasaki, N., Groves, J.D., and le Maire, M. 1998. Treatment with crystalline ultra-pure urea reduces the aggregation of integral membrane proteins without inhibiting N-terminal sequencing. *J Biochem (Tokyo)* **124**: 417-420.
- Soulié, S., Møller, J.V., Falson, P., and le Maire, M. 1996. Urea reduces the aggregation of membrane proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **236**: 363-364.
- Soulié, S., Neumann, J.M., Berthomieu, C., Møller, J.V., le Maire, M., and Forge, V. 1999. NMR conformational study of the sixth transmembrane segment of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Biochemistry* **38**: 5813-5821.
- Souza, D.O., and de Meis, L. 1976. Calcium and magnesium regulation of phosphorylation by ATP and ITP in sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem* **251**: 6355-6359.
- Stokes, D.L., and Green, N.M. 2000. Modeling a dehalogenase fold into the 8-A density map for Ca(2⁺)-ATPase defines a new domain structure. *Biophys J* **78**: 1765-1776.
- Sudbrak, R., Brown, J., Dobson-Stone, C., Carter, S., Ramser, J., White, J., Healy, E., Dissanayake, M., Larregue, M., Perrussel, M., et al. 2000. Hailey-Hailey disease is caused by mutations in ATP2C1 encoding a novel Ca(2⁺) pump. *Hum Mol Genet* **9**: 1131-1140.
- Sugita, Y., Miyashita, N., Ikeguchi, M., Kidera, A., and Toyoshima, C. 2005. Protonation of the acidic residues in the transmembrane cation-binding sites of the ca(2⁺) pump. *J Am Chem Soc* **127**: 6150-6151.
- Sumbilla, C., Cantilina, T., Collins, J.H., Malak, H., Lakowicz, J.R., and Inesi, G. 1991. Structural perturbation of the transmembrane region interferes with calcium binding by the Ca²⁺ transport ATPase. *J Biol Chem* **266**: 12682-12689.
- Sumida, M., Hamada, M., Takenaka, H., Hirata, Y., Nishigauchi, K., and Okuda, H. 1986. Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase of microsomal membranes from bovine aortic smooth muscle: effects of Sr²⁺ and Cd²⁺ on Ca²⁺ uptake and formation of the phosphorylated intermediate of the Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase. *J Biochem (Tokyo)* **100**: 765-772.
- Sumida, M., Wang, T., Mandel, F., Froehlich, J.P., and Schwartz, A. 1978. Transient kinetics of Ca²⁺ transport of sarcoplasmic reticulum. A comparison of cardiac and skeletal muscle. *J Biol Chem* **253**: 8772-8777.
- Suzuki, H., and Kanazawa, T. 1995. The tryptophan fluorescence change upon conformational transition of the phosphoenzyme intermediate in sarcoplasmic reticulum Ca(2⁺)-ATPase is revealed in the absence of K⁺ and the presence of lasalocid. *J Biol Chem* **270**: 3089-3093.
- Sweadner, K.J., and Donnet, C. 2001. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca(2⁺)-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* **356**: 685-704.
- Swift, J. 1726. A voyage to Lilliput, *Chapter One*.
- Swillens, S., Dupont, G., Combettes, L., and Champeil, P. 1999. From calcium blips to calcium puffs: theoretical analysis of the requirements for interchannel communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13750-13755.
- Tada, M., and Katz, A.M. 1982. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu Rev Physiol* **44**: 401-423.

- Takisawa, H., and Makinose, M. 1983. Occlusion of calcium in the ADP-sensitive phosphoenzyme of the adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **258**: 2986-2992.
- Tanford, C., Reynolds, J.A., and Johnson, E.A. 1985. Thermodynamic and kinetic cooperativity in ligand binding to multiple sites on a protein: Ca^{2+} activation of an ATP-driven Ca pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 4688-4692.
- Tang, X., Halleck, M.S., Schlegel, R.A., and Williamson, P. 1996. A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* **272**: 1495-1497.
- Taylor, C.W., and Traynor, D. 1995. Calcium and inositol trisphosphate receptors. *J Membr Biol* **145**: 109-118.
- Taylor, K.A., Dux, L., and Martonosi, A. 1986. Three-dimensional reconstruction of negatively stained crystals of the Ca^{2+} -ATPase from muscle sarcoplasmic reticulum. *J Mol Biol* **187**: 417-427.
- Thomas, J.L., and Tirrell, D.A. 1992. Polyelectrolyte-sensitized phospholipid vesicles. *Acc. Chem. Res.* **25**: 336-342.
- Toyoshima, C., and Inesi, G. 2004. Structural Basis of Ion Pumping by Ca^{2+} -Atpase of the Sarcoplasmic Reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**: 269-292.
- Toyoshima, C., and Mizutani, T. 2004. Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* **430**: 529-535.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **405**: 647-655.
- Toyoshima, C., and Nomura, H. 2002. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* **418**: 605-611.
- Toyoshima, C., Nomura, H., and Sugita, Y. 2003. Structural basis of ion pumping by Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **555**: 106-110.
- Toyoshima, C., Nomura, H., and Tsuda, T. 2004. Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature*.
- Toyoshima, C., Sasabe, H., and Stokes, D.L. 1993. Three-dimensional cryo-electron microscopy of the calcium ion pump in the sarcoplasmic reticulum membrane. *Nature* **362**: 467-471.
- Treiman, M., Caspersen, C., and Christensen, S.B. 1998. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *Trends Pharmacol Sci* **19**: 131-135.
- Tribet, C. 1998. Hydrophobically driven attachments of synthetic polymers onto surfaces of biological interest: lipid bilayers and globular proteins. *Biochimie* **80**: 461-473.
- Tribet, C., Audebert, R., and Popot, J.L. 1996. Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 15047-15050.
- Troullier, A., Girardet, J.L., and Dupont, Y. 1992. Fluoroaluminate complexes are bifunctional analogues of phosphate in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem* **267**: 22821-22829.
- Uhlemann, A.C., Cameron, A., Eckstein-Ludwig, U., Fischbarg, J., Iserovich, P., Zuniga, F.A., East, M., Lee, A., Brady, L., Haynes, R.K., et al. 2005. A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 628-629.
- Varadi, A., Lebel, L., Hashim, Y., Mehta, Z., Ashcroft, S.J., and Turner, R. 1999. Sequence variants of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -transport ATPase 3 gene (SERCA3) in Caucasian type II diabetic patients (UK Prospective Diabetes Study 48). *Diabetologia* **42**: 1240-1243.

- Varadi, A., Molnar, E., Ostenson, C.G., and Ashcroft, S.J. 1996. Isoforms of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase are differentially expressed in normal and diabetic islets of Langerhans. *Biochem J* **319** (Pt 2): 521-527.
- Vennerstrom, J.L., Arbe-Barnes, S., Brun, R., Charman, S.A., Chiu, F.C., Chollet, J., Dong, Y., Dorn, A., Hunziker, D., Matile, H., et al. 2004. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. *Nature* **430**: 900-904.
- Vial, F., Rabhi, S., and Tribet, C. 2005. Association of octyl-modified poly(acrylic acid) onto unilamellar vesicles of lipids and kinetics of vesicle disruption. *Langmuir* **21**: 853-862.
- Vieyra, A., Mintz, E., Lowe, J., and Guillain, F. 2004. Ca²⁺ binding to sarcoplasmic reticulum ATPase phosphorylated by Pi reveals four thapsigargin-sensitive Ca²⁺ sites in the presence of ADP. *Biochim Biophys Acta* **1667**: 103-113.
- Vigano, C., Smeyers, M., Raussens, V., Scheirlinckx, F., Ruyschaert, J.M., and Goormaghtigh, E. 2004. Hydrogen-deuterium exchange in membrane proteins monitored by IR spectroscopy: a new tool to resolve protein structure and dynamics. *Biopolymers* **74**: 19-26.
- Vilsen, B., and Andersen, J.P. 1986. Occlusion of Ca²⁺ in soluble monomeric sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta* **855**: 429-431.
- Vilsen, B., and Andersen, J.P. 1992. CrATP-induced Ca²⁺ occlusion in mutants of the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **267**: 25739-25743.
- Vilsen, B., and Andersen, J.P. 1998. Mutation to the glutamate in the fourth membrane segment of Na⁺,K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase affects cation binding from both sides of the membrane and destabilizes the occluded enzyme forms. *Biochemistry* **37**: 10961-10971.
- Wakabayashi, S., Ogurusu, T., and Shigekawa, M. 1990. Participation of H⁺ in the Ca²⁺(+)-induced conformational transition of 4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole-labeled sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochemistry* **29**: 10613-10620.
- Wakabayashi, S., and Shigekawa, M. 1990. Mechanism for activation of the 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole-labeled sarcoplasmic reticulum ATPase by Ca²⁺ and its modulation by nucleotides. *Biochemistry* **29**: 7309-7318.
- Wang, W., Cho, H.S., Kim, R., Jancarik, J., Yokota, H., Nguyen, H.H., Grigoriev, I.V., Wemmer, D.E., and Kim, S.H. 2002. Structural characterization of the reaction pathway in phosphoserine phosphatase: crystallographic "snapshots" of intermediate states. *J Mol Biol* **319**: 421-431.
- Wawrzynow, A., Theibert, J.L., Murphy, C., Jona, I., Martonosi, A., and Collins, J.H. 1992. Sarcolipin, the "proteolipid" of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, is a unique, amphipathic, 31-residue peptide. *Arch Biochem Biophys* **298**: 620-623.
- Wictome, M., Henderson, I., Lee, A.G., and East, J.M. 1992. Mechanism of inhibition of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum by thapsigargin. *Biochem J* **283** (Pt 2): 525-529.
- Wictome, M., Khan, Y.M., East, J.M., and Lee, A.G. 1995. Binding of sesquiterpene lactone inhibitors to the Ca(2+)-ATPase. *Biochem J* **310** (Pt 3): 859-868.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L., and Missiaen, L. 2002. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* **32**: 279-305.
- Xu, C., Ma, H., Inesi, G., Al-Shawi, M.K., and Toyoshima, C. 2004. Specific structural requirements for the inhibitory effect of thapsigargin on the Ca²⁺ ATPase (SERCA). *J Biol Chem*.
- Xu, G.G., Gao, Z.Y., Borge, P.D., Jr., Jegier, P.A., Young, R.A., and Wolf, B.A. 2000. Insulin regulation of beta-cell function involves a feedback loop on SERCA gene

expression, Ca(2+) homeostasis, and insulin expression and secretion. *Biochemistry* **39**: 14912-14919.

- Yamada, S., and Ikemoto, N. 1980. Reaction mechanism of calcium-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Substrates for phosphorylation reaction and back reaction, and further resolution of phosphorylated intermediates. *J Biol Chem* **255**: 3108-3119.
- Yamamoto, T., and Tonomura, Y. 1968. Reaction mechanism of the Ca⁺⁺-dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. II. Intermediate formation of phosphoryl protein. *J Biochem (Tokyo)* **64**: 137-145.
- Yamasaki, K., Daiho, T., Danko, S., and Suzuki, H. 2004. Multiple and distinct effects of mutations of Tyr122, Glu123, Arg324, and Arg334 involved in interactions between the top part of second and fourth transmembrane helices in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: changes in cytoplasmic domain organization during isometric transition of phosphoenzyme intermediate and subsequent Ca²⁺ release. *J Biol Chem* **279**: 2202-2210.
- Yang, A.S., Gunner, M.R., Sampogna, R., Sharp, K., and Honig, B. 1993. On the calculation of pK_as in proteins. *Proteins* **15**: 252-265.
- Yasuoka, K., Kawakita, M., and Kaziro, Y. 1982. Interaction of adenosine-5'-O-(3-thiotriphosphate) with Ca²⁺, Mg²⁺-adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum. *J Biochem (Tokyo)* **91**: 1629-1637.
- Young, H.S., Xu, C., Zhang, P., and Stokes, D.L. 2001. Locating the thapsigargin-binding site on Ca(2+)-ATPase by cryoelectron microscopy. *J Mol Biol* **308**: 231-240.
- Yu, X., Hao, L., and Inesi, G. 1994. A pK change of acidic residues contributes to cation countertransport in the Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Role of H⁺ in Ca(2+)-ATPase countertransport. *J Biol Chem* **269**: 16656-16661.
- Zhang, P., Toyoshima, C., Yonekura, K., Green, N.M., and Stokes, D.L. 1998. Structure of the calcium pump from sarcoplasmic reticulum at 8-A resolution. *Nature* **392**: 835-839.
- Zhang, Z., Lewis, D., Sumbilla, C., Inesi, G., and Toyoshima, C. 2001. The role of the M6-M7 loop (L67) in stabilization of the phosphorylation and Ca(2+) binding domains of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase (SERCA). *J Biol Chem* **276**: 15232-15239.
- Zhong, L., and Inesi, G. 1998. Role of the S3 stalk segment in the thapsigargin concentration dependence of sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase inhibition. *J Biol Chem* **273**: 12994-12998.

Résumé

L'ATPase- Ca^{2+} SERCA1a est une protéine membranaire exprimée majoritairement dans la fibre musculaire à contraction rapide. Elle catalyse le transport, du cytoplasme vers la lumière du réticulum sarcoplasmique, de deux ions Ca^{2+} par molécule d'ATP hydrolysée; ce transport actif est réalisé contre le gradient de concentration, et il a un rôle crucial pour la relaxation musculaire. A mon arrivée au laboratoire, deux structures cristallographiques de cette protéine avaient été publiées. Elles permettaient de comprendre certains aspects du fonctionnement de l'ATPase, mais laissaient quelques zones d'ombre. En particulier, le rôle de l'un des domaines de la protéine, le domaine A était encore obscur. Nous avons étudié les conséquences de la déstabilisation de ce domaine par une protéolyse ménagée par la protéinase K, et avons ainsi pu mettre en évidence le rôle primordial de ce domaine A dans le processus de déphosphorylation. Les données structurales ne permettaient pas non plus de comprendre complètement le rôle que la boucle cytoplasmique reliant les segments transmembranaires M6 et M7, la boucle L6-7, pouvait avoir sur la fixation des ions Ca^{2+} . Nous avons donc étudié l'effet sur le fonctionnement de l'ATPase de la mutation de certains résidus de cette boucle, et ainsi montré son implication dans les communications entre domaines cytosoliques et domaine transmembranaire.

Ces différents travaux ont été réalisés alors que, en 2004, quatre nouvelles structures de SERCA1a dans différentes conformations étaient élucidées par cristallographie des rayons X. Ces nouvelles structures se sont révélées être extrêmement utiles pour interpréter les études fonctionnelles. Toutefois, nous avons réalisé que l'une d'entre elles, la structure obtenue en présence de Ca^{2+} et d'AMPPCP, un analogue non hydrolysable de l'ATP, était paradoxale, car elle suggérait des propriétés des sites de fixation du Ca^{2+} incompatibles avec certaines données expérimentales. Nous avons montré que les conditions de cristallisation sont la cause de ce paradoxe, et, plus précisément, que c'est sans doute la présence de concentrations importantes de Ca^{2+} pendant la cristallisation qui conduit l'ATPase ayant fixé l'AMPPCP à adopter une conformation peut-être différente de sa structure réelle en solution. Nous nous sommes ensuite intéressés aux conformations que peut adopter l'ATPase en absence de Ca^{2+} mais en présence de composés fluorés supposés la stabiliser dans des conformations proches de son état phosphorylé «E2P». Certaines de ces conformations ont déjà été étudiées par cristallographie. Nous avons confirmé expérimentalement qu'elles ne représentaient pas complètement la vraie conformation phosphorylée E2P; et nous avons montré que la forme obtenue en présence d'un autre composé fluoré, le fluorure de béryllium, serait un bien meilleur analogue de cet état phosphorylé. Mais il faudrait pour cela réussir à cristalliser la protéine en absence des inhibiteurs traditionnellement utilisés à cette fin, car ces inhibiteurs perturbent la conformation de l'ATPase au niveau de ses segments transmembranaires et bloquent l'ouverture vers la lumière du réticulum de l'analogue fluoré du dérivé phosphorylé.

Enfin, nous avons participé à l'étude de polymères amphiphiles, les amphipols, conçus pour maintenir les protéines membranaires stables en solution. Nous avons d'abord montré que ces amphipols ne peuvent pas solubiliser les membranes mais que, propriété non anticipée, ils permettent de prévenir la floculation des membranes au cours du temps. Par ailleurs, si ces polymères s'avèrent efficaces pour stabiliser sous forme soluble de nombreuses protéines membranaires, SERCA1a comprise, cette stabilisation s'accompagne pour SERCA1a d'une inhibition de l'activité ATPasique. Nous avons réalisé une étude comparative de différents amphipols afin de comprendre cette contrepartie, pour certaines protéines membranaires, à l'effet bénéfique de ces amphipols.

Mots clefs: changements de conformation, transport actif, protéolyse ménagée, mutagenèse dirigée, fluorescence intrinsèque et extrinsèque, enzymologie préstationnaire, cristallographie, interactions protéines membranaires-surfactants.

Résumé

L'ATPase- Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique est une protéine membranaire dont plusieurs conformations ont été résolues par cristallographie des rayons X. Ces structures ont été précieuses pour l'interprétation de nos études fonctionnelles sur le rôle du domaine A et de la boucle L6-7 de l'ATPase. Mais nous avons montré que les conditions de cristallisation aboutissent parfois à des structures paradoxales : la présence de concentrations importantes de Ca^{2+} pendant la cristallisation en présence d'AMPPCP conduit l'ATPase à adopter une conformation probablement différente de sa structure moyenne en solution; de même, dans les conformations de l'ATPase proches de l'état phosphorylé «E2P», les inhibiteurs généralement utilisés pour stabiliser l'ATPase bloquent de façon artéfactuelle l'ouverture des sites Ca^{2+} vers la lumière du réticulum. Nous avons tenté de comprendre les avantages et inconvénients de divers polymères amphiphiles conçus pour stabiliser en solution les protéines membranaires.

Mots clefs: protéines membranaires, surfactants, changements de conformation fluorescence intrinsèque, enzymologie préstationnaire, cristallographie.

Summary

Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase is a membrane protein for which several conformations have been determined by X-ray crystallography. These structures have been very useful to guide interpretation of our functional studies of the role of the A domain and of the L6-7 loop in Ca^{2+} -ATPase. However, we have shown that crystallization conditions may sometimes induce artefactual structures. Thus, the presence of high concentrations of Ca^{2+} during the crystallization process may favour for the AMPPCP-bound enzyme a structure different from the average one prevailing in solution. Similarly, inhibitors generally used to stabilize Ca^{2+} -free ATPase close the access from the lumen to its Ca^{2+} binding sites in «E2P-like» states. We have finally documented and attempted to understand both advantages and drawbacks to the use of amphipatic polymers for stabilisation of membrane proteins in solution.

Key words: membrane proteins, surfactants, conformational changes, intrinsic fluorescence, pre-steady state enzymology, crystallography.